

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Efecto de la inhibición dual de GSK-3 y PDE-7 en un modelo murino
de esclerosis lateral amiotrófica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

María Gabriela Atencia Cebreiro

Director
Alberto García Redondo

Madrid, 2016

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Efecto de la inhibición dual de GSK-3 y PDE-7 en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica

Memoria presentada para optar al grado de Doctor
Universidad Complutense de Madrid, 2015



María Gabriela Atencia Cibreiro
Dirección - Dr. Alberto García Redondo

Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Don Alberto García Redondo, Técnico Titulado Superior y responsable del grupo de investigación en ELA asociado al Laboratorio de Enfermedades raras, mitocondriales y neuromusculares del Instituto de Investigación I+12 del Hospital 12 de Octubre,

CERTIFICA:

Que la memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada Doña María Gabriela Atencia Cibreiro con el título “**Efecto de la inhibición dual de GSK-3 y PDE-7 en un modelo murino de Esclerosis Lateral Amiotrófica**” ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Enfermedades raras, mitocondriales y neuromusculares del Hospital 12 de Octubre, y se corresponde con el proyecto de tesis aprobado por la Comisión de Doctorado 2005, cumpliendo por tanto las condiciones requeridas para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que así conste, firma la presente en Madrid, a

Fdo: Alberto García Redondo

La defensa de una tesis doctoral esconde más trabajo que el evidenciado en los resultados que se exponen, y es sostenido especialmente por quienes tienen a su cargo la dirección del laboratorio y del tesista.

Quiero agradecer entonces a los Dres. Joaquín Arenas Barbero y Miguel Angel Martín Casanueva, respectivamente alma máter y director del laboratorio de Enfermedades raras, mitocondriales y neuromusculares del Instituto de Investigación I+12 del Hospital 12 de Octubre; al Dr. Jesús Esteban Pérez, director de la Unidad de ELA; y al responsable de su grupo de investigación, mi amigo y director de tesis, el Dr. Alberto García Redondo.

Este trabajo hubiera sido aún más arduo de no haber contado con el apoyo desinteresado de mis compañeros de trabajo. Su participación indirecta en la asistencia técnica ha hecho posible su culminación. El siguiente es el largo listado de quienes me ayudaron a lo largo de estos años.

- *En asistencia y cuidado de los ratones: Pedro Monterreal*
- *En manipulación general de los animales, anestesia y disección: Montse Grau y Marbella Gracia García*
- *Inyección intraperitoneal: Adolfo Quiñones Lombraña y Beatriz Gómez*
- *Manejo de la colonia, genotipado y marcaje: LAGENBIO – Zaragoza*
- *Asistencia en los test de comportamiento: Alexandra Juárez Rufián*
- *Efecto del DMSO en la preparación del fármaco: Inmaculada García Ruiz*
- *Perfusión: Ximena Alvira Botero*
- *Inclusión de los tejidos, corte y tinción: Agi Krzyzanowska*
- *Técnicas histológicas: Alexandra Juárez Rufián*
- *Inmunohistología: Laura España Serrano y Eva Carro*
- *Microscopía: Laura España Serrano*
- *Cultivo primario de astrocitos: Adolfo Quiñones Lombraña y Carlos Spuch*
- *Dinámica mitocondrial: María Morán Bermejo*
- *Western blot: Inés García Consuegra, Ana Cris Calvo Rojo y Lorena Marín Buera*
- *ELISA: Rocío Pérez González*
- *Graph Pad: Grupo de investigación de Reumatología del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital “12 de Octubre”*

A todos ellos, muchas gracias.

Y finalmente dejo volar mi gratitud hacia Emilia “Miluchi” Sevilla Formariz. Su presencia otrora y su recuerdo ahora, siguen dando sentido a la investigación y a la lucha por mantenerla en pie.

Viejo, Gnomo, Aplá y Emaio, obviamente...



1. <u>Resumen/ Summary</u>	13
2. <u>Introducción</u>	
2.1. Antecedentes	17
2.2. Diagnóstico y criterios de clasificación de la ELA	20
2.3. Epidemiología	20
2.4. Diferencias entre géneros	21
2.4.1 Supervivencia y evolución de la ELA en los pacientes respecto al género	25
2.5. Etiología	29
2.6. Patogénesis de la degeneración de motoneuronas en la ELA	29
2.6.1 SOD-1	30
2.6.2 Disfunción mitocondrial	31
2.6.3 Neuroinflamación y contribución a la patología de células no neuronales	32
2.7. Enzimas diana del Inhibidor VP1.15: GSK-3 y PDE-7	34
2.9.1 Glucógeno Sintetasa Kinasa (GSK-3)	34
2.9.1.1 Función y regulación de GSK-3	35
2.9.1.1.1 Regulación por fosforilación	35
2.9.1.1.2 Regulación de GSK-3 mediante localización intracelular	36
2.9.1.1.3 Regulación de GSK-3 mediante proteínas de unión	
2.9.1.2 GSK-3 regula la arquitectura celular y la motilidad	37
2.9.1.3 Papel de GSK-3 en la muerte celular neuronal	34
2.9.1.4 Papel de GSK-3 β en la ELA	37
2.9.1.5 Inhibidores de GSK-3 β – El Litio	39
2.9.2 AMPc y Fosfodiesterasas	41
2.9.2.1 Las Fosfodiesterasas como agentes terapéuticos	43
2.9.2.2 Terapéutica de los inhibidores de PDE en el SNC	43
2.9.2.3 PDE-7 como diana para las enfermedades del SNC	44
2.10 Moléculas diana reguladas por GSK-3 y PDE-7: CREB, β -catenina y AMPc	45
2.10.1 Papel del AMPc en el Sistema Nervioso Central	45
2.10.2 CREB: Función en el Sistema Nervioso Central	45
2.10.2.1 CREB: Relación con GSK-3 y sus inhibidores	49
2.10.2.2 CREB y su relación con la ELA	50
2.10.3 Ruta de señalización Wnt y relación con β -catenina	50
2.10.3.1 Función de β -catenina y regulación vía GSK-3	51
2.10.3.2 Relación de β -catenina en las patologías del Sistema Nervioso	51
2.10.3.4 β -catenina y ELA	48

2.11	VP1.15: Inhibidor dual de GSK-3 y PDE-7.....	51
2.12	El ratón SOD1-G93A: modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica.....	53
2.12.2	Estudios realizados con Riluzole en el modelo murino SOD1- G93A.....	55
3.	Objetivos	59
4.	Materiales y métodos	61
4.1	Diseño del ensayo preclínico con VP1.15.....	61
4.2	Manejo de la colonia de ratones SOD1-G93A.....	61
4.2.1	Sexado.....	62
4.2.2	Marcado auricular de los animales.....	63
4.2.3	Extracción de ADN y genotipado de los animales.....	63
4.3	Estudios comportamentales.....	64
4.3.1	Determinación del peso.....	64
4.3.2	Deterioro neuromotor.....	65
4.3.3	Test de la rejilla.....	65
4.4	Preparación de VP1.15, dosificación, vía de administración y esquema de tratamiento.....	66
4.5	Sacrificio de los animales y perfusión. Extracción de muestras.....	66
4.6	Histología.....	67
4.6.1	Corte de tejidos.....	67
4.6.2	Tinción de hematoxilina-eosina para visualización de fibras musculares.....	68
4.6.3	Tinción de Nissl para visualización de neuronas.....	68
4.6.4	Inmunohistoquímica.....	69
4.7	Cultivo primario de astrocitos.....	69
4.8	Tinción de mitocondrias en astrocitos vivos.....	70
4.9	Determinación de la concentración tisular de AMPc mediante ELISA.....	70
4.10	Determinación de la expresión de CREB y β -catenina mediante ELISA.....	71
4.11	Expresión proteica de GSK-3, pSer9 GSK-3, PDE7b, GFAP y OPA1 Western blot.....	72
4.11.1	Preparación de las muestras.....	72
4.11.2	Cuantificación y preparación de proteínas.....	73
4.11.3	SDS Page.....	73
4.11.4	Transferencia.....	74
4.11.5	Inmunodetección de proteínas.....	74
4.12	Estudios estadísticos.....	76
5.	Resultados	77
5.1	Ensayos de toxicidad.....	77
5.2	Análisis de supervivencia.....	78
5.3	Análisis de la evolución de la enfermedad (parámetros: peso, debilidad muscular y escala neurológica).....	85
5.3.1	Peso.....	85

	Índice
5.3.2 Escala neurológica.....	86
5.3.3 Debilidad muscular (test de la rejilla).....	89
5.4 Análisis histológico.....	92
5.4.1 Atrofia muscular.....	92
5.4.2 Degeneración neuronal en la médula espinal.....	93
5.4.3 Astrogliosis.....	94
5.5 Fragmentación de la red mitocondrial en astrocitos.....	97
5.6 Estudio de la concentración de AMPc.....	100
5.6.1 Encéfalo.....	100
5.6.2 Médula.....	100
5.6.3 Músculo.....	102
5.6.4 Hígado.....	102
5.7 Análisis de expresión de β -catenina y CREB.....	103
5.7.1 Expresión de β -catenina.....	104
5.7.1.1 Encéfalo.....	104
5.7.1.2 Médula.....	104
5.7.1.3 Músculo.....	106
5.7.1.4 Hígado.....	107
5.7.2 Expresión de CREB.....	107
5.7.2.1 Encéfalo.....	107
5.7.2.2 Médula.....	108
5.7.2.3 Músculo.....	109
5.7.2.4 Hígado.....	109
5.8 Expresión de las enzimas GSK-3 y PDE-7.....	109
5.8.1 Expresión de GSK-3 fosforilada y defosforilada en Ser9.....	110
5.8.2 Expresión de PDE-7.....	112
5.9 Evaluación de la neuroinflamación.....	113
5.9.3 Expresión de GFAP.....	113
6. <u>Discusión</u>	115
6.1 Eficacia de VP1.15 respecto a la supervivencia y la evolución de la enfermedad.....	115
6.2 Alteraciones histológicas en médula y músculo de los animales estudiados.....	116
6.3 Rutas de señalización moduladas por GSK-3 y PDE-7. Nivel de AMPc.....	116
6.4 Eficacia inhibitoria de VP1.15.....	117
6.5 Efecto de VP1.15 sobre la neuroinflamación.....	117
6.6 Efecto de VP1.15 sobre la dinámica mitocondrial.....	118
6.7 Diferencias intergenéricas en ELA.....	119
6.8 Acción diferencial de VP1.15 entre géneros: Una explicación hipotética.....	120
7. <u>Conclusiones</u>	123
8. <u>Bibliografía</u>	125
9. <u>Anexo</u>	147

BREVIATURAS

ADN	Acido desoxirribonucleico
ADP	Adenosin difodfato
AKT	PKB
ALSFRS	ALS Functional Rating Scale
AMP	Atrofia Muscular Progresiva
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
APC	Adenomatous polyposis coli protein
APC	Activated protein C
AR	Receptor de andrógenos
ARN	Acido ribonucleico
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
ATM	Proteína de unión a CRE
ATP	Adenosín trifosfato
BCL-2	B cell lymphoma 2
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
Bzip	Basic Leucine Zipper domain
C9ORF72	Chromosome 9 open reading frame 72
CAD	Carbamoyl phosphate synthetase/aspartate transcarbamoylase/ dihydroorotase
CaMKII	Calmodulin dependent protein kinase II
CBP	CREB binding protein
Cdc42	Cell division control protein 42
CDK5	Cyclin dependent like kinase 5
COX-2	Ciclooxygenasa 2
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element binding
CVF	Capacidad vital forzada
DFTL	Demencia Frontotemporal Lobular
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DVL	Differential Vasculat Labeling
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington
ELA	Esclerosis Lateral Amiotrófica
ELAe	Esclerosis Lateral Amiotrófica esporádica
ELAf	Esclerosis Lateral Amiotrófica familiar
ELAj	Esclerosis Lateral Amiotrófica juvenil
ELP	Esclerosis Lateral Primaria
EN	Escala neurológica
EP	Enfermedad de Parkinson
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ER α	Receptor de estrógenos α
FOXO	Forkhead box protein O
FRAT	Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas
FUS	Proteína de unión al ARN (Fusionada en Sarcoma)
GFAP	Glial fibrillary acidic protein

GMPC	Guanosín monofosfato cíclico
GS	Glucógeno sintetasa
GSK-3	Glucógeno sintetasa quinasa 3
HIF1	Hipoxia-inducible factor 1
HSTF-1	Heparin secretory-transforming factor 1
IC50	Median Inhibition Concentration
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IGF-IR	Insulin-like growth factor receptor
IL2	Interleucina 2
IS	Intervalo de supervivencia
JNK	Jun N-terminal kinase
KID	Kinase insert domain
KIX	KID-binding domain
LRP	Elemento de respuesta al AMPc (cAMP response element)
MAP1B	Microtubule-associated protein 1B
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MAPs	Mitogen activated protein
NMDA	N metil D-aspartato
NS	no significativo
NSC34	Mouse motoneuronal cell line 34
OPA1	Optic Atrophy 1
OR	Odds ratio
p300	Histone acetyltransferase p300
p38	cellular tumor antigen p38
PAR6	Partitioning-defective protein 6
PBP	Parálisis Bulbar Progresiva
PCR	Polimerasae Chain Reaction
PDE	Fosfodieterasa
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PI-3-quinasa	Fosfoinositol 3 quinasa
PKA	Protein kinase A
pol	polimerase
PP1	Protein phosphotase 1
PP2A	Protein phosphatase 2A
ROR	Receptor of tyrosine kinase orphan receptor
RR	Riesgo Relativo
RYK	Receptor of tyrosine kinase
SFB	Suero fetal bovino
SLN	Señal de localización nuclear
SMN1	Survival of motor neuron 1
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido Dismutasa 1
SOX	Sex determining region Y
SRY	Sex-determining region Y
TARDBP	Transactive response DNA binding protein

TAU	T protein
Taq pol	Thermus aquaticus DNA polimerase
TCF/LEF	Transcription factor/ Lymphoid enhancer binding factor
TDP-43	Proteína de unión al sitio TAR del ADN-43kD
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WNT	Wingless /integrated

RESUMEN

Introducción:

La Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa en la que mueren progresivamente las neuronas motoras de la corteza cerebral y la médula, con la consiguiente atrofia de los músculos inervados por ellas.

Si bien últimamente han aparecido distintos modelos animales para el estudio de la ELA, los ratones que sobre-expresan el gen *SOD1* humano con la mutación G93A, son los más utilizados. Estos son los animales que empleamos en nuestro estudio, en el cual evaluamos un inhibidor dual de las enzimas GSK-3 y PDE-7 llamado VP1.15.

La Glucógeno Sintetasa Kinasa -3 (GSK-3) es una serina-treonina kinasa con múltiples funciones celulares y neurofisiológicas. En el Sistema Nervioso Central, la isoforma más abundante corresponde a GSK-3 β , cuya actividad está regulada negativamente por fosforilación en la Ser9. Su sobre-expresión se asocia con la muerte neuronal, la hiperfosforilación en Tau y la retracción de las neuritas en cultivos de neuronas. Por eso es vista como partícipe de la patofisiología de las enfermedades neurodegenerativas. En particular, su aumento ha sido detectado en la médula de los pacientes con ELAe.

La superfamilia de las Fosfodiesterasas (PDEs) comprende enzimas ubicuas con capacidad de metalofosfohidrolasas que hidrolizan AMPc y/o GMPc llevándolos a sus respectivos monofosfatos inactivos. PDE-7 es una PDE específica para AMPc. Su inhibición actúa como neuroprotectora en cultivos celulares y en modelos de infarto experimental, disminuye la activación inflamatoria y la supervivencia de precursores de oligodendrocitos en cultivos primarios de neuronas, reduce los síntomas clínicos en el modelo murino de encefalomyelitis autoinmune y la alteración cognitiva en el modelo murino de Enfermedad de Alzheimer (EA).

Los mecanismos regulatorios y de señalización celular modulados por GSK-3 y PDE-7, involucran a CREB, β -catenina y los niveles de AMPc, moléculas que serán estudiadas en profundidad en esta investigación.

Objetivos:

El objetivo principal del trabajo es evaluar la eficacia terapéutica de VP1.15 mediante el análisis de su efecto sobre la supervivencia, la evolución neurológica, la pérdida de masa muscular y la pérdida de resistencia frente al esfuerzo del modelo murino SOD1-G93A.

La afectación de médula y músculo se estudia en este contexto como soporte para visualizar su efecto sobre los tejidos implicados en la patología.

Paralelamente se evalúa la eficiencia de la inhibición de GSK-3 y su efecto sobre la expresión de CREB y β -catenina, y la eficiencia de la inhibición de PDE-7 sobre la concentración de AMPc.

Asimismo se analiza el efecto de VP1.15 sobre la alteración de la dinámica mitocondrial y el control de la neuroinflamación.

Resultados:

El estudio se realizó en un modelo murino SOD1-G93A, utilizando 30 hembras y 22 machos. La mitad de las hembras y de los machos fueron inoculados intraperitonealmente con VP1.15, y el resto fue utilizado como control e inyectado con vehículo. El diseño experimental fue a doble ciego.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos de animales tratados y no tratados respecto a su supervivencia, tanto en los machos como en las hembras. Cuando el análisis se realizó para evaluar la condición neurológica, el peso y la debilidad muscular, solo se encontraron diferencias significativas en machos.

Para evaluar la eficacia de VP1.15 a nivel molecular se analizaron los niveles de expresión en distintos tejidos de CREB y β -catenina mediante ELISA, GSK-3 α/β activa, P Ser9 GSK-3 inactiva y PDE-7 mediante Western blot por sus relaciones con las rutas inhibidas por VP1.15. También se estudió la concentración de AMPc por ELISA. En ningún caso se encontraron diferencias significativas entre los grupos de hembras y machos transgénicos SOD1-G93A, pero es importante hacer notar que el nivel de P Ser GSK-3 inactiva en médula se incrementó en los dos géneros.

El estudio de la neuroinflamación se realizó mediante Western blot por medición de GFAP y se encontró que VP1.15 disminuye su expresión controlando la astrogliosis

También se realizó un acercamiento a la investigación de la dinámica mitocondrial basados en nuestros propios estudios sobre cultivos primarios de astrocitos de ratón SOD1-G93A. En las hembras tratadas se observa una disminución de la expresión de OPA1 en encéfalo y médula.

Conclusiones:

VP1.15 aumenta la supervivencia de los ratones machos SOD1-G93A y mejora sus parámetros de evolución neurológica, peso y debilidad muscular. Por el contrario, no tiene efecto positivo sobre las hembras.

Su efecto a nivel anti-neuroinflamatorio es positivo e independiente del sexo evaluado. Por el contrario, VP1.15 podría estar alterando la dinámica mitocondrial de las hembras.

La evolución clínica de los ratones SOD1-G93A es dependiente del sexo, y tiene correlación con el efecto terapéutico del fármaco. Dicha observación puede relacionarse con lo visto en humanos.

SUMMARY

Introduction:

Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS) is a progressive neurodegenerative disease where motor neurons die in the cerebral cortex and spinal cord, resulting in the weakness of muscles innervated by them.

While recently it was appear different animal models that reproduced ALS, but mice that overexpressed human *SOD1* with G93A mutation are the most used.

These animals were used in our study, where we evaluated a dual inhibitor of GSK-3 and PDE-7 enzymes called VP1.15, that it was synthesized for Ana Martínez's group in Instituto de Química médica of CSIC.

Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) is a serine–threonine kinase with diverse cellular and neurophysiological functions. In the Central nervous system, the isoform more expressed is GSK-3 β . The activity is negatively regulated by phosphorylation at Ser9.

GSK-3 is expressed at synaptic level in both mature and immature nerves. Several studies show the importance attached to growth and axonal polarity, axonal remodeling, neurogenesis, neuronal plasticity, neurotransmitter release and activity-dependent bulk endocytosis. GSK-3 overexpression has been associated with neuronal death, tau hyperphosphorylation, and neurite retraction in cultured neurons, then may be linked to the pathophysiology of neurodegenerative diseases. In particular, increased levels of GSK-3, have been detected in the spinal cord of patients with sporadic ALS.

Phosphodiesterases (PDEs) are a large superfamily of ubiquitously metallophosphohydrolase enzymes that hydrolyze cAMP and/or cGMP to their respective inactive monophosphates. PDE7 is a cAMP-specific PDE. PDE7 inhibition acts as neuroprotective agent in cellular cultures and experimental stroke model, decrease inflammatory activation on primary neural cultures and survival of oligodendrocyte precursors, reduces clinical symptoms in the experimental autoimmune encephalomyelitis mouse model and cognitive impairment in a mouse model of Alzheimer disease.

Overview of regulation and cell signaling modulated by GSK3 and PDE7 involve CREB, beta catenin and cAMP level, molecules that are deep studied in this work.

Objetives:

The aim of this assay is evaluate the therapeutic properties of VP1.15 by study its effect about survival, neurological status, loss of mass muscle and loss of effort resistance in *SOD1*-G93A mouse model.

Spinal Cord and muscle involvement is studied in this context like support for visualize its effect on the tissues implicated in the pathology.

Also is evaluated the efficiency in GSK-3 inhibition and the effect on CREB and β -catenin expression, and the efficiency in PDE-7 on cAMP concentration.

Finally, is evaluated VP1.15 effect on alteration of mitochondrial dynamic and the control of neuroinflammation.

Results:

The study was made on a total of 30 female SOD1-G93A mice and 22 male SOD1-G93A mice. A group of 15 females were inoculated with VP1.15 and the other 15, with vehicle alone. Of the males, 11 were treated with the drug, while others 11 were assigned as controls and injected without VP1.15.

No significant differences were found between treated and untreated males and between treated and untreated females at survival analysis.

When analysis was performed for evaluate neurological status, weight and muscle weakness, statistical significance was found only in transgenic males.

Several molecular analysis were performed by study the expression level in different tissues of CREB and β -catenin by testing with ELISA, active GSK-3 α/β , inactive P Ser9 GSK-3 and PDE-7 by testing with Western blot, for its supposed direct relation with inhibition pathway produced by VP1.15. Also it was studied cAMP concentration by ELISA. It was found no significant differences between groups of female and male transgenic SOD1-G93A mice in protein expression studied and in cAMP concentration, but is important to note that expression level of P Ser9 GSK-3 was increased in all cases.

Neuroinflammation was study by measurement of GFAP by Western blot and we found that VP1.15 decreases GFAP expression with consequent control of astroglyosis.

Also we performed an approach for investigate mitochondrial dynamics based on our previous studies about primary cultures of transgenic SOD1-G93A and normal mice's astrocytes. No significant differences were found between treated and no treated mice when expression level of OPA1 protein was study by Western blot in brain and spinal cord of SOD1-G93A studied.

Conclusions:

VP1.15 increases the survival of SOD1-G93A males and it improve the parameters of neurological status, weigth and muscular weakness. But this drug has not positive effect on females.

Its effect at neuro-inflammatory level is positive and gender independent. At contrary, VP1.15 could be altering mitochondrial dynamic in females.

Clinical evolution of SOD1-G93A mice is gender-dependent, and it has correlation with VP1.15 therapeutic effect. This observation can relate to that seen in humans.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales:

- 1- Antecedentes
- 2- Criterios diagnósticos y de clasificación
- 3- Epidemiología
- 4- Diferencias de género
- 5- Etiología
- 6- Patogénesis de la degeneración de motoneuronas en la ELA

2.1 - Antecedentes

La esclerosis lateral amiotrófica (ELA) es una enfermedad neurodegenerativa de curso fatal, caracterizada por una parálisis muscular progresiva producida por la muerte de motoneuronas en la corteza motora primaria, el tracto corticoespinal, el tronco cerebral y la médula espinal (1).

Es decir, se encuentran afectadas:

- la primera neurona motora (o neurona motora superior) con soma en la corteza cerebral y axones dirigidos hacia el tronco del encéfalo o la médula espinal
- la segunda neurona motora (o neurona motora inferior) que inerva el músculo desde la médula espinal.

Se la conoce también como “Enfermedad de Lou Gehrig” (en EEUU) en recuerdo a un famoso jugador estadounidense de beisbol aquejado por la enfermedad que vivió a principios del SXX, “Enfermedad de Charcot” (en Francia) puesto que fue el neurólogo francés Jean-Marie Charcot, el primero en describir la enfermedad (*Charcot JM & Joffroy A – Arch. Hysiol. Neurol. Pathol. 2,744 - 1869*) y “Enfermedad de Neurona Motora” (en Reino Unido). Sin embargo hay que hacer una aclaración respecto a este último término. Al hablar de Enfermedad de Neurona Motora se incluyen otros síndromes: Atrofia Muscular progresiva (AMP), Esclerosis Lateral Primaria (ELP), Parálisis Bulbar Progresiva (PBP), ELA con participación multisistémica (por ejemplo, ELA con demencia), Diplejía Braquial Amiotrófica y Forma Pseudoneurítica de ELA. Entonces en la práctica clínica, ELA es el término más empleado para referirse a la forma más común de la enfermedad, que corresponde a la forma clásica identificada por Charcot en 1869 (1).

A raíz de las últimas investigaciones, si bien se la considera como una entidad clínica en la que están afectadas las neuronas motoras superiores e inferiores también se ven involucradas las células gliales, y es vista como un síndrome que suele aparecer con Degeneración Frontotemporal Lobular (DFTL). Tal es así que ambas

La ELA tiene varias peculiaridades:

- Es una enfermedad rara
- Su desarrollo varía con la edad y el sexo
- Su etiología es desconocida
- No puede ser prevenida

enfermedades son extremos de un mismo continuo patológico en el que están vinculados genes comunes (2).

Es importante añadir que los pacientes pueden o no presentar antecedentes familiares en su historia clínica. De hecho, una amplia mayoría de ellos no los presenta y no tienen mutaciones en los genes relacionados con la enfermedad (los más importantes son: *C9ORF72*, *SOD1*, *TARDBP*, *FUS*). Por esta razón, se entiende que en el desarrollo de la enfermedad participan factores medioambientales que podrían influir en la epigenética de cada caso (3) – **Figura 2.1**

El examen genético para ELA y DFTL es posible, pero su análisis genera problemas. Estas son las razones:

- La patogenicidad y penetrancia de algunas mutaciones no está suficientemente dilucidada
- Si la base de la enfermedad es oligogenética, para que ésta se presente haría falta que el individuo tuviera mutaciones en por lo menos dos genes
- La correlación entre genotipo y fenotipo en la mayoría de los genes es baja y el efecto pleiotrópico a nivel fenotípico en algunos genes es alto (4)

De esta forma el consejo genético para los afectados y sus familiares en primer y segundo grado resulta complicado. Los individuos asintomáticos con riesgo de padecer alguna de estas enfermedades deben someterse a examen en el marco de proyectos de investigación (5)

Período presintomático:

*Aún cuando no se registra
síntomatología clínica,
aparecen anormalidades en
los estudios de neuro-
imagen, electrofisiología o
cognitivos*

Período preclínico:

*No aparecen marcadores de
enfermedad identificados
hasta este momento*

No existe ningún tratamiento efectivo excepto la administración de Riluzole. Este fármaco es un benzotiazol: un inhibidor de procesos relacionados con el glutamato, que lleva mediante un mecanismo no dilucidado a aumentar apenas unos pocos meses la supervivencia de los afectados. Además, en un trabajo reciente, se evidencia que su efecto solo es positivo en los primeros 6 meses de tratamiento (6). Por lo tanto, la terapia paliativa y la ventilación no invasiva son estrategias obligadas en el manejo de los pacientes como recurso para mejorar su calidad de vida y aumentar su supervivencia.

Los esfuerzos destinados para encontrar otros agentes terapéuticos capaces de detener la enfermedad no han sido eficaces. Esto podría deberse a que la expresión fenotípica anómala comienza mucho antes de la aparición de los síntomas clínicos, y que la respuesta terapéutica podría ser mejor si fuera empleada en fases preclínicas.

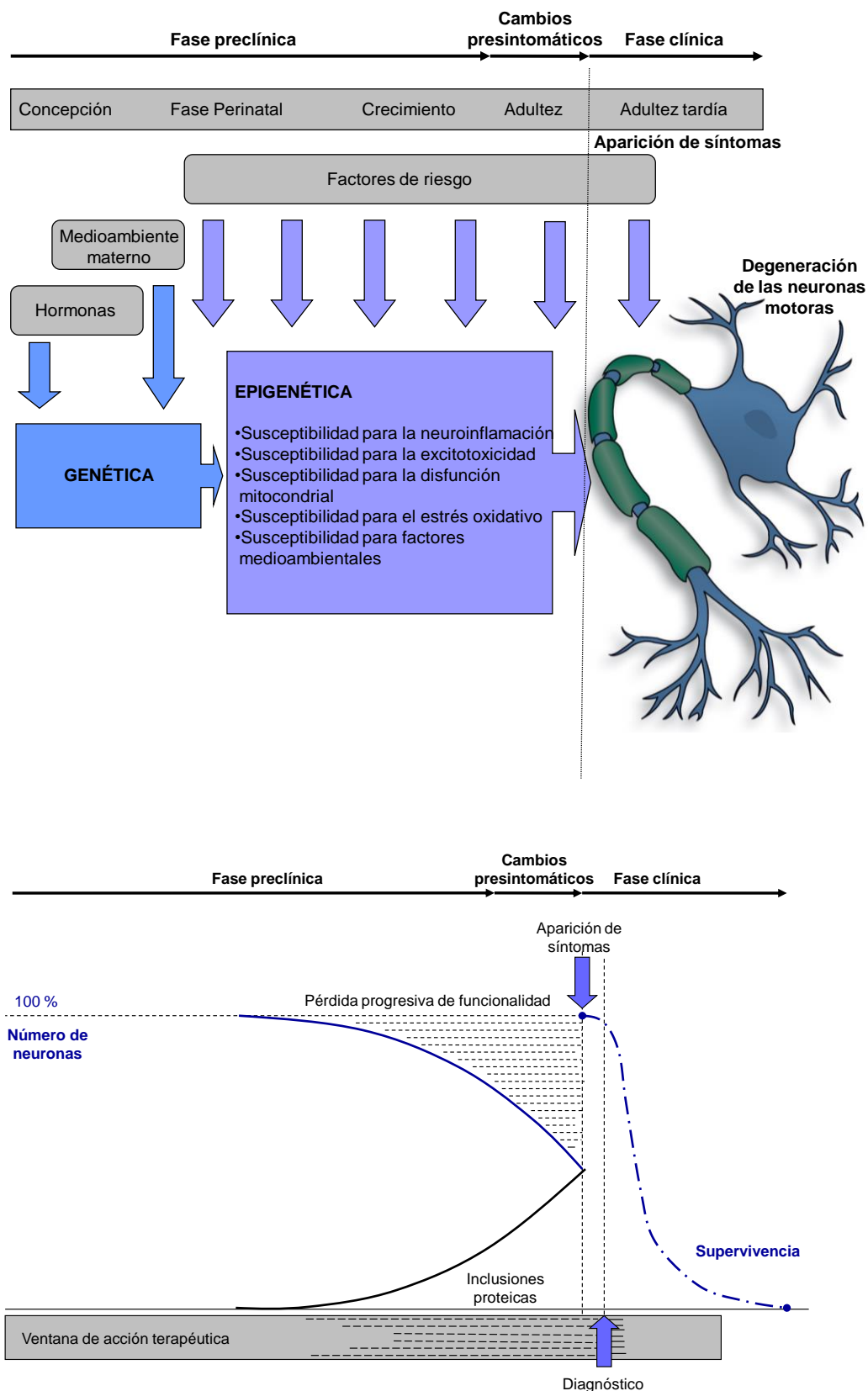


Figura 2.1: Desarrollo de la ELA desde el momento del nacimiento. Los factores genéticos y epigenéticos interaccionan e influyen en la susceptibilidad/sensibilidad a la enfermedad. Modificado de "Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period?" – Eisen A et al. *J.Neurol Neurosurg Psychiatry* 2014; 85:1232-1238

2.2 - Diagnóstico y criterios de clasificación de la ELA

Su nombre hace mención a las características básicas encontradas en la clínica y anatomía patológica de los pacientes **(1)**:

- "Esclerosis lateral" por el endurecimiento de los nervios corticoespinales anteriores y laterales, debido a que degeneran las neuronas motoras de estas áreas y se produce inflamación
- "Amiotrófica" por la atrofia de las fibras musculares que al sufrir denervación, degeneran, llevan a la debilidad evidente de los afectados y a la aparición de fasciculaciones.

El diagnóstico de la enfermedad se basa en la observación de determinadas características clínicas:

- Signos de afectación de primera motoneurona **(1)**: Debilidad muscular, hipertonía y espasticidad
- Signos de afectación de la segunda motoneurona **(1)**: Debilidad y atrofia muscular, fasciculaciones y abolición de reflejos

Estos hallazgos son sugerentes de ELA si no pueden ser explicados por cualquier otra enfermedad y la progresión es compatible con este trastorno neurodegenerativo **(1)**.

Todos los pacientes pueden clasificarse en fenotipos según la combinación de información clínica que presentan **(1)**:

- Sitio de inicio (bulbar, extremidad superior o inferior)
- Tipo de debilidad (afectación predominante de neurona motora superior o inferior)

Además, la ELA puede clasificarse según la existencia o no de antecedentes familiares. Así se la divide en **(1)**:

- ELA esporádica (ELAe): Aquellos casos en que no aparecen antecedentes familiares en la historia clínica (corresponde al 90% de los casos totales de ELA)
- ELA familiar (ELAf): Aquellos casos en los que el paciente relata la presencia en su familia de afectados por la enfermedad. Usualmente se relaciona a la ELAf con causas genéticas determinadas, pero no siempre es así (corresponde al 10% de los casos totales de ELA)

Por último, se habla de ELA juvenil (ELAj) para definir aquellos casos en que la enfermedad aparece antes de los 25 años **(1)**.

2.3 - Epidemiología

Con la excepción del Pacífico oeste (Isla de Guam) que presenta focos de alto riesgo, la incidencia mundial de la ELA fluctúa entre 1,5 a 2,7 por 100.000 habitantes año **(1,7,8)**, y su prevalencia es de 2,7 a 7,4 por 100.000 habitantes **(9)**. Para las poblaciones afroamericanas y latinoamericanas instaladas en USA, parece que la frecuencia de ELA es menor que entre los blancos de origen europeo, pero aun así cabe destacar que la diferencia es muy leve **(10)**.

Hay varias observaciones en la literatura que apoyan la idea de una creciente incidencia de esta enfermedad, pero aparentemente es debido al paulatino

envejecimiento de la población, a un mayor número de casos evaluados y a un mejor diagnóstico (11).

La ELA es muy poco frecuente en menores de 30 años y casi nula en menores de 20. Resulta más común entre los 50 y 60 años con un claro aumento con la edad hasta los 70 (11). También es ligeramente más frecuente en hombres que en mujeres, siendo la razón hombre/mujer semejante a 1,5:1 (12).

2.4 - Diferencias de género

El 54% de las diferencias fenotípicas encontradas en los fenotipos de la ELA se explica por la edad y el género (13). Existen cuatro fenotipos en la ELA, que son predominantemente masculinos. Ellos son: el fenotipo clásico o de Charcot, el fenotipo respiratorio, el síndrome "brazo fláxido" y el fenotipo de motoneurona superior puro (13)

Comparando las publicaciones aparecidas en los últimos 40 años en las que se estudia la relación entre pacientes mujeres y hombres, la relación hombre / mujer, cayó de 2,6 a 1 (en la década 1965-1974) a 1,1 a 1 (en 1990). Esta diferencia puede ser explicada en parte por:

- los diferentes diseños de los estudios (retrospectivo en el caso más antiguo y prospectivo en los estudios más recientes)
- la diferente distribución geográfica de los estudios
- las frecuencias podrían verse alteradas al presumir que las mujeres tienden a concurrir con mayor facilidad al médico y porque ellas podrían (debido al cambio del estilo de vida imperante actualmente) estar expuestas a factores medioambientales desconocidos involucrados en el desarrollo de la ELA (se encontró un aumento del riesgo para padecer la enfermedad entre las mujeres fumadoras pero no para los hombres).

Los hombres presentan mayor incidencia (3 cada 100.000 habitantes/año) y prevalencia que las mujeres (2,4 cada 100.000/año) (14), en ellos se presentan más casos tempranos y la enfermedad se inicia más frecuentemente con síntomas distales. En cambio en las mujeres el inicio de la enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia con síntomas bulbares. Por último aparece una disminución de la razón hombre/mujer con la edad (2,5 por debajo de los 40 años y 0,75 por encima de los 80

Existen diferencias de género en cuanto a prevalencia e incidencia de la enfermedad, la aparición temprana de la sintomatología, la edad de presentación y las características clínicas.

- *La frecuencia de la ELA permanece más o menos constante en las poblaciones de origen europeo distribuidas en todo el mundo*
- *Los factores de riesgo medio ambiental parecen ser múltiples, pero los estudios realizados para identificarlos no resultan reproducibles ni definitivos.*

años) (15) – **Figuras 2.2 y 2.3.**

La presentación “brazos flácidos” que es relativamente rara y que implica debilidad evidente en las extremidades superiores, es de 4 a 9 veces más frecuente en hombres que en mujeres. Se presenta a edades más tempranas (50,8 +/- 12,3 años) y tiene mayor supervivencia que otros fenotipos **(15,16)**.

En algunos trabajos donde solo se estudian casos de ELAf, se observa una relación entre géneros de 1:1, lo cual implicaría asumir dominancia autosómica y penetrancia total. En estos casos las diferencias de sexo no parecen ser relevantes y aun así se ha publicado que en una familia con la mutación dominante Phe20Cys en SOD1, las mujeres tenían muy baja penetrancia **(15)**.

Por otro lado no parece haber diferencias significativas en la supervivencia de pacientes hombres y mujeres, aunque unos pocos trabajos sugieren una peor supervivencia en mujeres **(13,15)**.

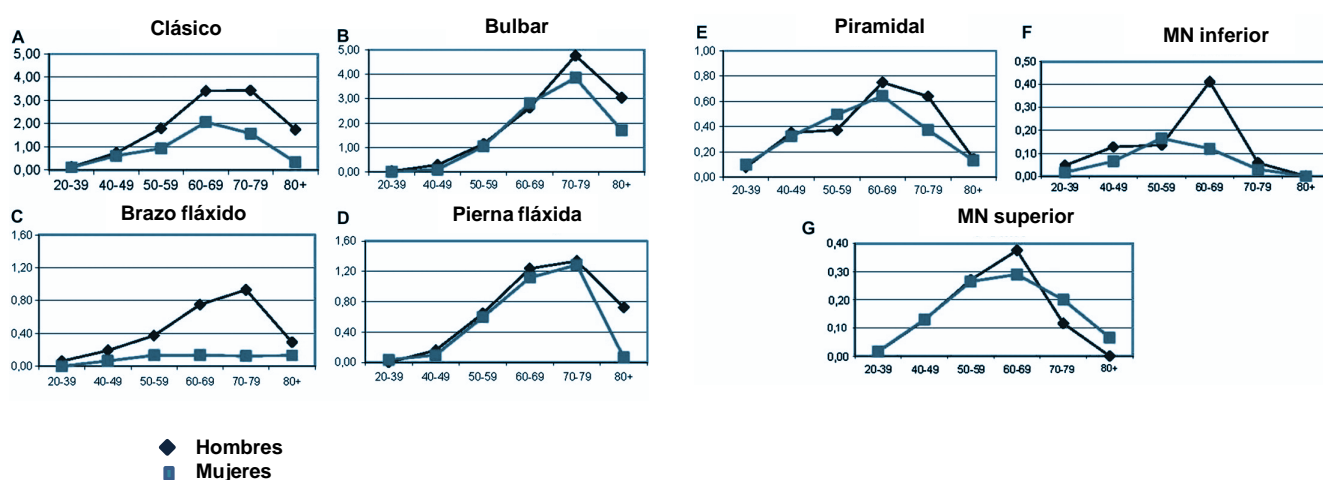


Figura 2.2: Fenotipos de ELA y su relación con los sexos y la edad de aparición

Extraído de “Phenotypic heterogeneity of Amyotrophic Lateral Sclerosis: a population based study” – Chio A et al – J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011;82:740-746

Asimismo parece haber más casos de demencia en hombres vinculada a mutaciones en el gen TARDBP, no así el deterioro cognitivo que no presenta mayores alteraciones en ambos sexos **(15)**. Esta diferencia genérica en cuanto a la frecuencia de casos, especialmente en edades tempranas e inicio distal o bulbar podrían sugerir que el desarrollo de la enfermedad está modulado por factores hormonales y en particular por los efectos postulados para los estrógenos (neuroprotectores) o los andrógenos (neurotóxicos) **(15)**.

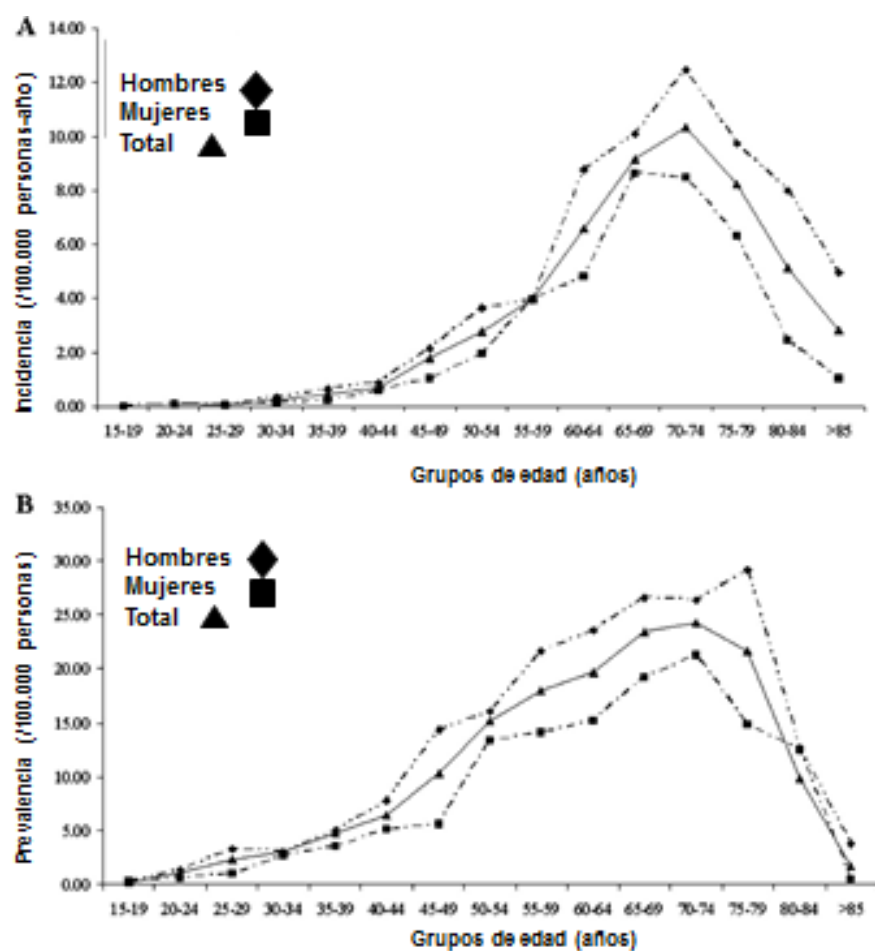
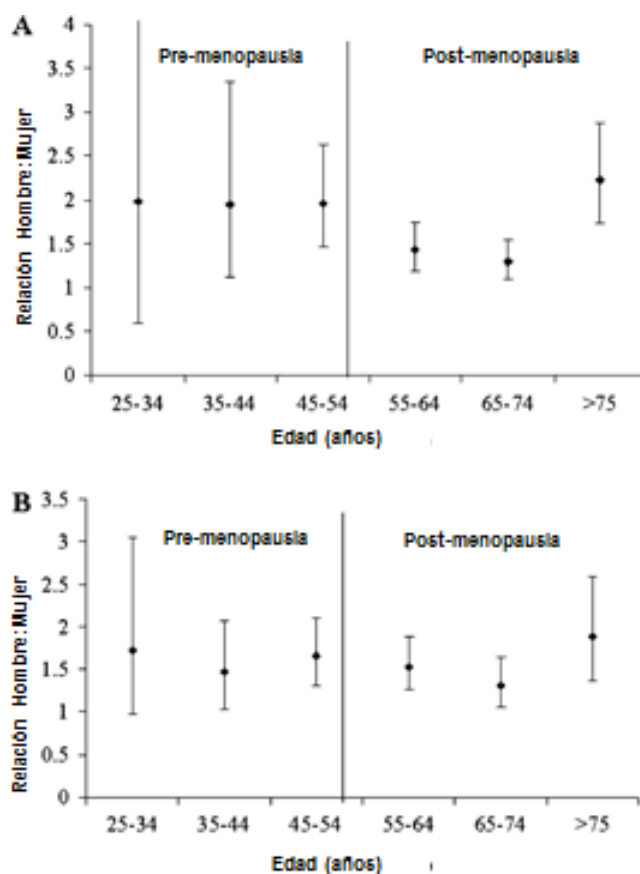


Figura 2.3: Incidencia en relación a la edad, el sexo y la condición pre y post menopáusica. Modificado de "Population based epidemiology of Amyotrophic lateral sclerosis using capture-recapture methodology" – Huisman M et al. – J Neurol Neurosurg Psychiatry 2011;82:1165-1170



También se postula que son diferentes los factores ambientales que operan sobre hombres y mujeres y que, aun cuando fueran los mismos, estos efectos podrían actuar y modularse distinto (por ejemplo: vulnerabilidad diferente al tabaco y al ejercicio) (15).

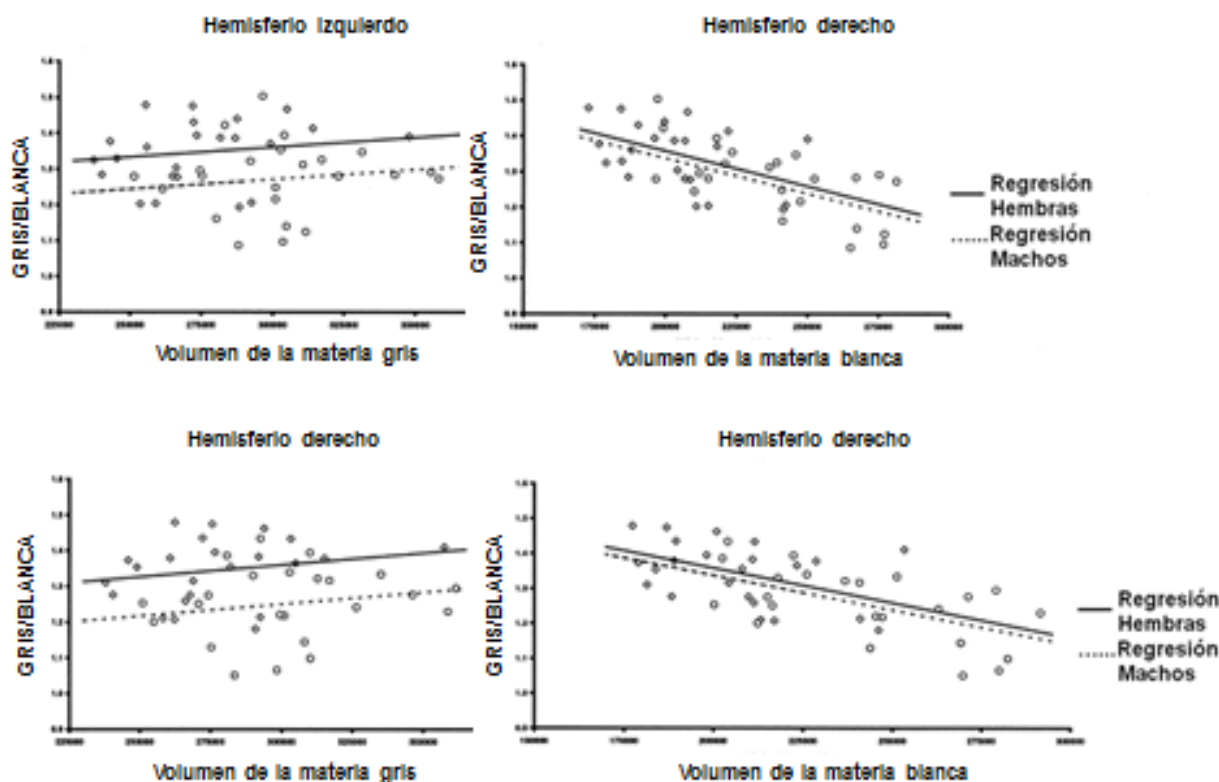


Figura 2.4: experimentos donde se demuestra la diferente relación de materia gris y materia blanca entre sexos.

Modificado de "Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum" – Allen JS et al – *Neuroimage* 2003;18:880-894

En cuanto al Sistema Nervioso Central (SNC) de las ratas se observan diferencias entre ambos sexos, respecto al volumen de materia gris/blanca, cantidad y tamaño de células (17,18). La densidad de oligodendrocitos en el cuerpo calloso, el formix y la médula es de 20 a 40% mayor en machos que en hembras de roedores (19) – **Figuras 2.4 y 2.5**. Si las vías superiores e inferiores de las neuronas motoras son diferentes en hombres y mujeres, entonces existiría la posibilidad de que presenten distintas susceptibilidades al daño. En lo que respecta a la ELA, aunque el número de neuronas motoras es similar en los dos sexos, la excitabilidad de los axones del tracto cortico-espinal no lo es (1,20–22).

Además se sabe que el XII nervio craneal (o nervio hipoglosa) se afecta en la enfermedad mientras que el nervio craneal III (o nervio oculomotor) resiste. Esto podría deberse a la expresión diferencial de las subunidades NR2B del receptor de N-metil D aspartato (NMDA). Puesto que la expresión de NR2B es 2,1 veces superior en

el nervio hipogloso respecto a su expresión en el nervio oculomotor, y dado que el estradiol influye en la funcionalidad del NMDAR, podría explicarse la diferencia de susceptibilidad entre géneros en el desarrollo de la ELA bulbar (más frecuente en las mujeres) – **Figura 2.6 (23–27)**

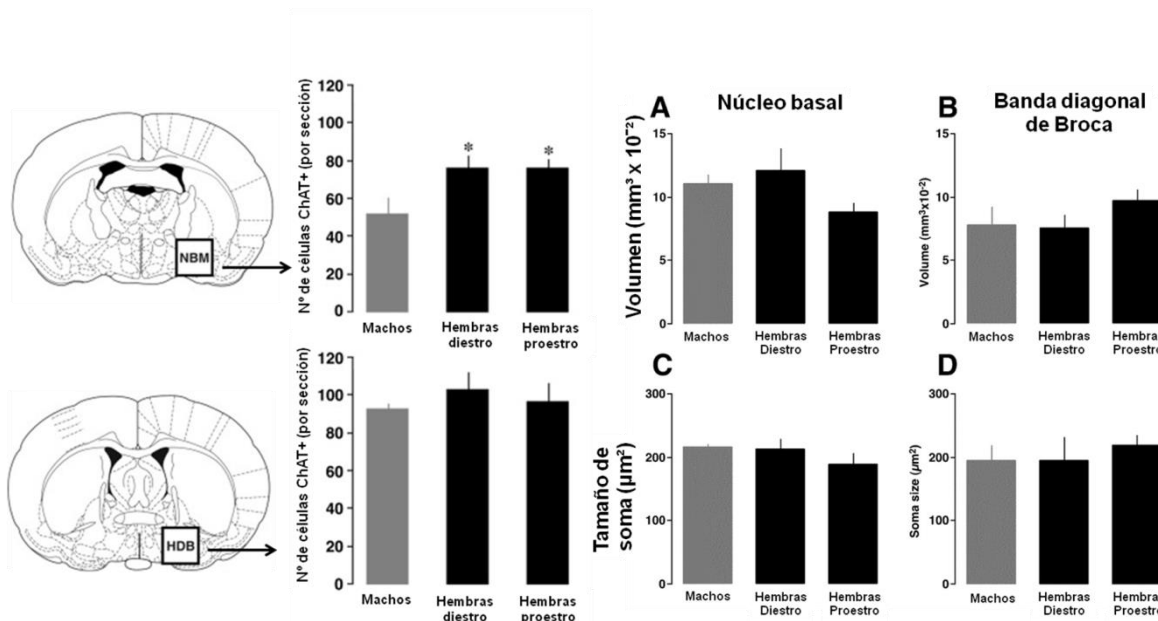
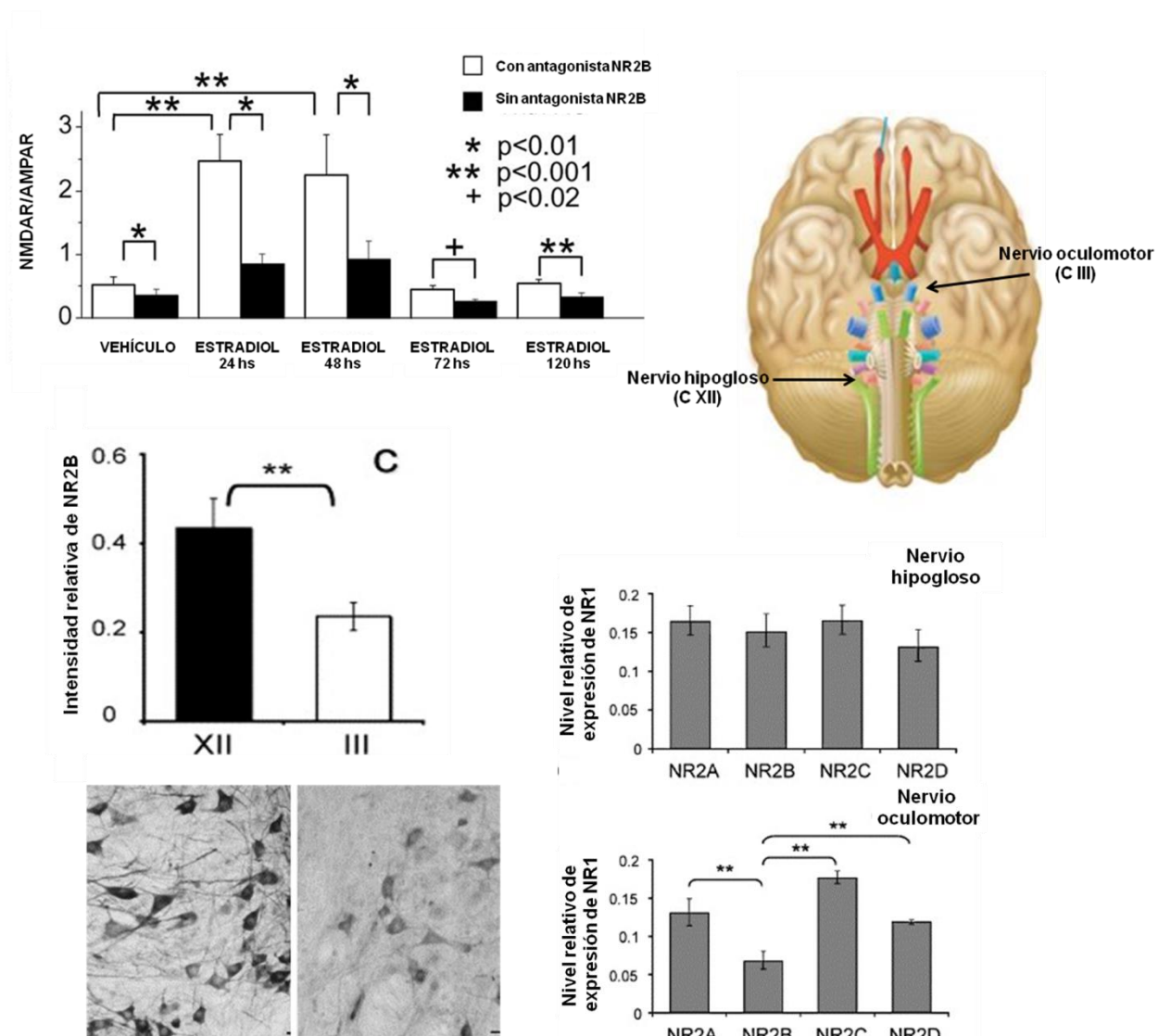


Figura 2.5: Experimentos que demuestran la diferencia en cuanto a cantidad de células, tamaño de las mismas y volumen del Núcleo Basal (NBM) y de la Banda diagonal de Broca (BDB) entre géneros. Extraído de “Sex-specific 24h acetylcholinesterase profile in the medial prefrontal cortex: Simultaneous measurement of spontaneous locomotor activity in behaving rats” – Takase K et al – Neuroscience. 2009:159:7-15

Por último, se encuentran diferencias en cuanto a la habilidad para reparar el daño (las mujeres se recuperan más rápidamente en caso de ictus, los hombres pierden mayor volumen cerebral con la edad) y esto podría ser relevante para entender las diferencias del curso clínico de la ELA. La densidad de oligodendrocitos en el cuerpo caloso, el formix y la médula es de 20 a 40% mayor en machos que en hembras de roedores (15,28–30).

2.4.1 - Supervivencia y evolución de la ELA en los pacientes respecto al género

En nuestro laboratorio se realizaron estudios de Kaplan Meier teniendo en cuenta la supervivencia y ciertos valores de Capacidad Vital Forzada (CVF - entre 65 y 75) y del Test funcional ALSFRS (entre 22 y 26) que se consideran clínicamente indicativos de seria afectación en la enfermedad



Los datos fueron clasificados según derivaban de pacientes que en el momento de manifestar sus síntomas eran mayores de 50 años (relación Hombre/Mujer =1,09) o menores de 47 años. De esta forma, se quiso evaluar el posible efecto neuroprotector que los estrógenos tienen en las mujeres jóvenes. Todos aquellos datos que provenían de pacientes en peri-menopausia fueron eliminados.

Los pacientes mayores de 50 años (hombres y mujeres) presentaron similares curvas de supervivencia ($p=0,8702$, Tasa de riesgo relativo=1,0413) - **Figura 2.7**. Tampoco aparecieron diferencias significativas respecto a los parámetros clínicos

considerados (Para CVF, $p=0,4203$, Tasa de riesgo relativa=0,7008; Para ALSFRS, $p=0,0649$, Tasa de riesgo relativa=0,5239) - **Figuras 2.8 y 2.9.**

Exitus

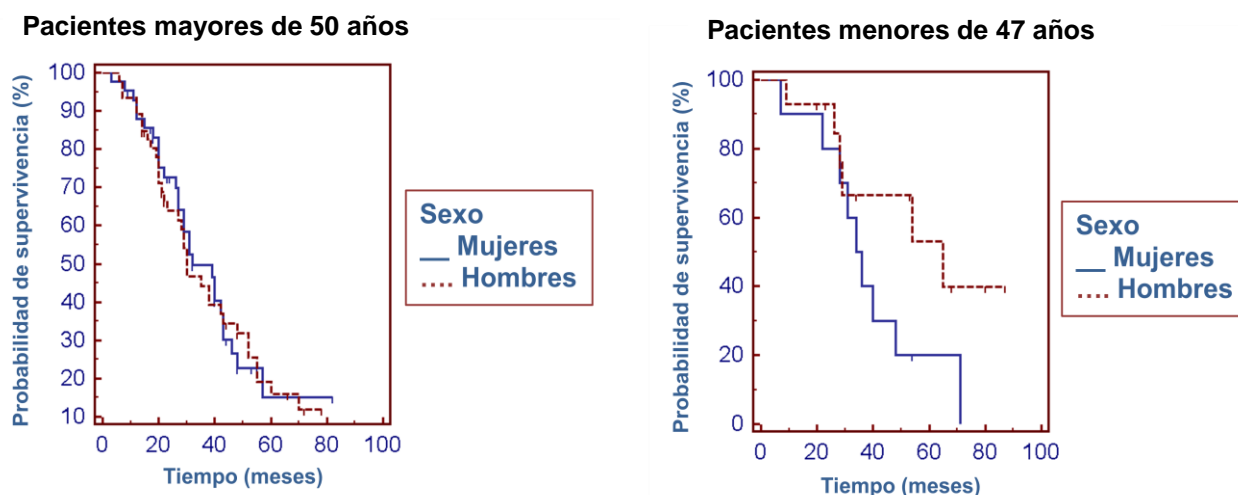


Figura 2.7: Gráficos de Kaplan Meier en los que se registra la supervivencia de los pacientes según sexo y franja etaria.

Pacientes mayores de 50,1 años (N mujeres=41, N hombres=45): Hombre/Mujer=1,09, $p=0,8702$ y Tasa de riesgo relativo=1,0413

Pacientes menores de 46,7 años (N mujeres=10, N hombres=14):Hombre/Mujer=1,4, $p=0,1056$ y Tasa de riesgo relativo=0,4422

En la muestra de pacientes menores de 47 años, las curvas de supervivencia demostraron que no parece haber diferencias entre géneros ($p=0,1056$ y Tasa de riesgo relativo = 0,4422). Al considerar el comportamiento de los parámetros clínicos el tamaño reducido de la muestra no permitió sacar resultados concluyentes (Para CVF: N mujeres=7, N hombres=1; para ALSFRS: N mujeres=5, N hombres=4) - **Figuras 2.7, 2.8 y 2.9**

Se evidenció una ligera tendencia positiva a favor de los hombres puesto que aproximadamente el 40% de ellos aún sobreviviría a los 70 meses de comenzada la enfermedad. Paradójicamente, las mujeres mantendrían mejores valores de ALSFRS respecto a los que presentan los hombres en el mismo tiempo ($p=0,7421$, Tasa de riesgo relativo=1,3841).

22<ALSFRS<26

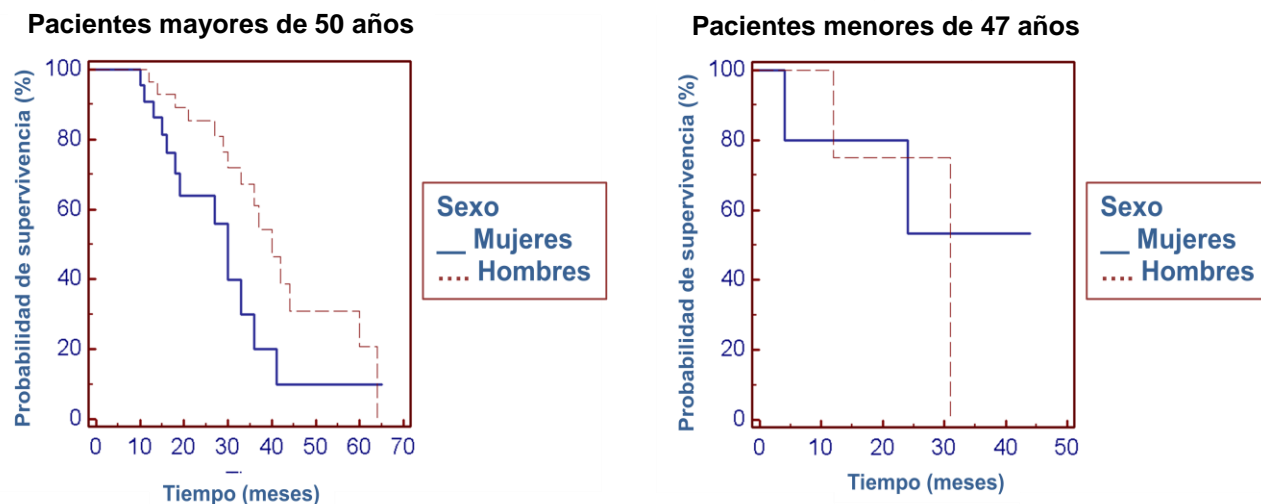


Figura 2.8: Gráficos de Kaplan Meier en los que se registra un valor de ALSFRS entre 22 y 26 en los pacientes según sexo y franja etaria.

Pacientes mayores de 50,1 años (N mujeres=22, N hombres=30), $p=0,0649$ y Tasa de riesgo relativo=0,5239

Pacientes menores de 46,7 años (N mujeres=10, N hombres=14), $p=0,1056$ y Tasa de riesgo relativo=0,4422

65<CVF<75

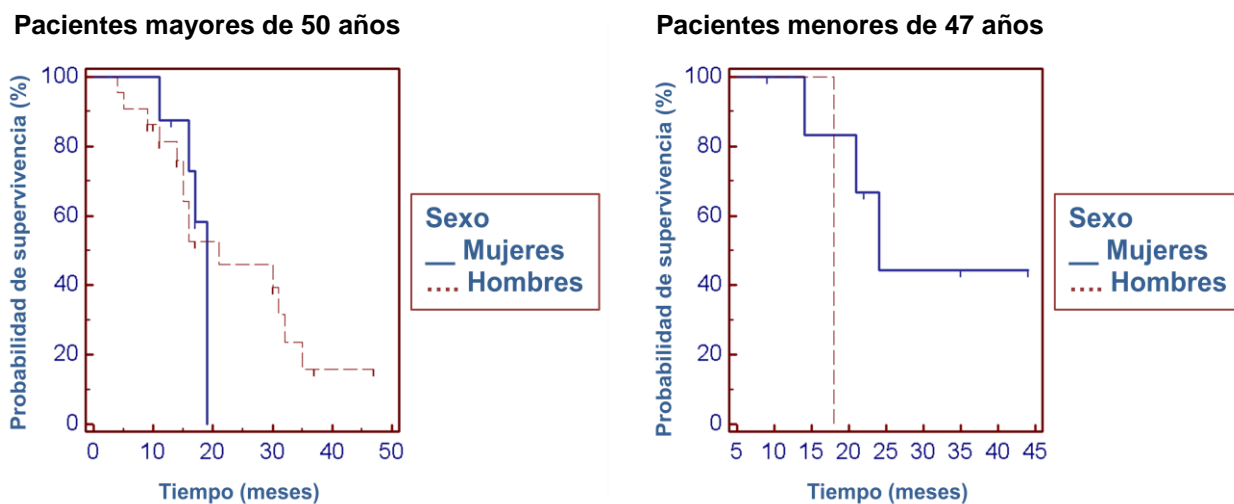


Figura 2.9: Gráficos de Kaplan Meier en los que se registra un valor de CVF entre 65% y 75% en los pacientes según sexo y franja etaria.

Pacientes mayores de 50,1 años (N mujeres=8, N hombres=22), $p=0,4203$ y Tasa de riesgo relativo=0,7008

Pacientes menores de 46,7 años (N mujeres=7, N hombres=1), $p=0,1768$ y Tasa de riesgo relativo=0,3944

2.5 - Etiología

Actualmente se reconoce la existencia de una compleja interacción genético-ambiental como factor causal de la degeneración de las neuronas motoras.

Hasta el momento los factores relacionados con el estilo de vida (tabaquismo, consumo de antioxidantes, actividad deportiva, índice de masa corporal), los vinculados a exposiciones ocupacionales o medioambientales (campos electromagnéticos, metales pesados, pesticidas, β metil amino L-alanina, infecciones virales) o confluencia de otras patologías (trauma craneal, enfermedades metabólicas, cáncer, enfermedades inflamatorias), no han demostrado fehacientemente estar vinculadas al desarrollo de la ELA. El conocimiento de estos factores (que debieran complementar los impresionantes avances realizados en los últimos años), aún permanece elusivo y es necesario para aclarar los mecanismos epigenéticos que están operando en la enfermedad (31).

2.6 - Patogénesis de la degeneración de motoneuronas en la ELA

Los mecanismos moleculares que operan en la patogenia de la ELA son complejos y se interconectan entre sí. No es infrecuente que al estudiar un punto en particular se termine vinculando otros (32,33).

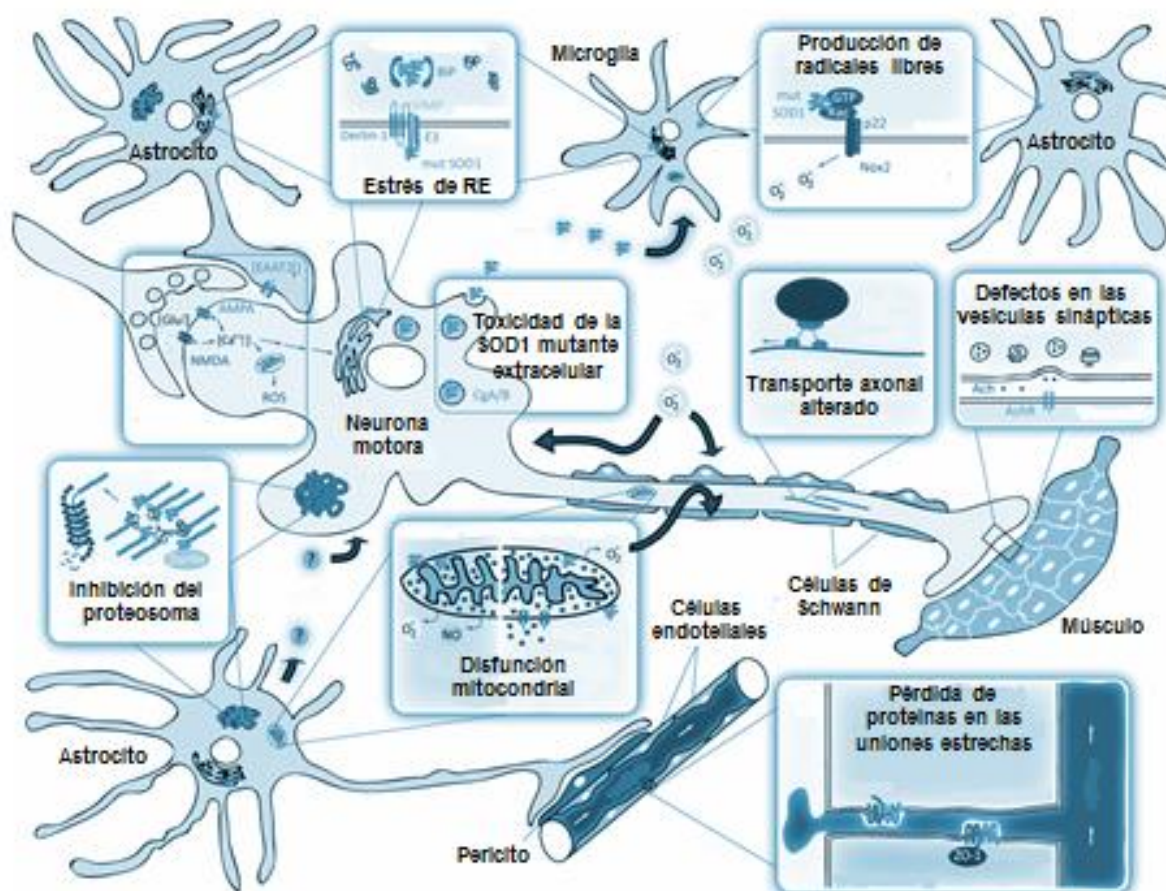


Figura 2.10: Mecanismos celulares involucrados en la patogénesis de la ELA.

Extraído de "Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond" – Ilieva H, Polymenidou M & Cleveland D – J. Cell Biol. Vol 187, N°6 (2009)

En particular se ampliarán los siguientes aspectos: Relación de la Superóxido Dismutasa 1 (SOD-1) en la patología, Disfunción mitocondrial con énfasis en su dinámica y Neuroinflamación – **Figura 2.10**

2.6.1 - **SOD1**

Entre el 12 y el 23,5% de los casos de ELAf (según estudios europeos y norteamericanos) y el 2% de las ELAe muestran mutaciones en el gen que codifica para la enzima citoplasmática superóxido dismutasa (SOD1).

El gen SOD1 se localiza en el cromosoma 21q22.1 y está formado por 5 exones que codifican un polipéptido de 153 aminoácidos con una masa de 16 kDa.

En general se observa que las mutaciones provocan una reducción de la actividad de la proteína, pero en particular las mutaciones G38R, A90V y D90A, no provocan variaciones de la actividad, y no aparece correlación entre la severidad de la enfermedad y su funcionalidad. De ahí que se entienda que la SOD1 gana una función tóxica que lleva a la degeneración motoneuronal **(34)**. Esta teoría además es sustentada porque **(35)**:

- Los ratones knock-out para SOD1 no desarrollan enfermedad de neurona motora
- Los ratones transgénicos que sobre-expresan SOD1 humana nativa tampoco presentan alteraciones de motoneurona
- Solo los ratones transgénicos que sobre-expresan la SOD1 humana mutada desarrollan la enfermedad

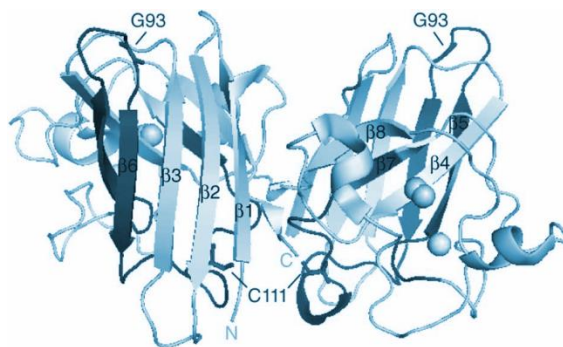
SOD1 es una proteína homodimérica ubicua y citosólica. Cada una de las

subunidades está estabilizada por un ión Zinc y uniones hidrofóbicas entre sus hojas plegadas β . Además, en cada uno de sus centros catalíticos aparece un ión Cobre - **Figura 2.11**.

Está ampliamente distribuida en eucariotas y muy conservada entre especies y tejidos.

SOD1 cataliza la reacción de peroxidación de aniones superóxido en peróxido de hidrógeno y oxígeno:
 $O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} + H_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$

Figura 2.11: Estructura de la proteína SOD1 normal por cristalografía de rayos X (Protein database: 2çC9V). se resalta la ubicación del residuo G93.
 Extraído de “Wild-type and mutant SOD1 share an aberrant conformation and common pathogenic pathway in ALS” – Bosco D et al – Nature Neuroscience 13, 1396-1403 (2010)



Se la encuentra erróneamente plegada y modificada a raíz de la presencia de mutaciones en el gen *SOD1*, en las motoneuronas y en las células gliales de la médula espinal de los individuos afectados con ELA. Este hecho permite suponer que las enzimas mutantes ganan de forma progresiva una función tóxica, determinada por la formación de agregados intracelulares **(36,37)**. Así, aun cuando su función principal está vinculada con el sistema detoxificante celular, en la patología de la ELA se implica en la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la axonopatía y el tráfico endosomal **(32,37)**. Bajo una conformación anómala, *SOD1* interacciona con Derlina1 (proteína esencial en el transporte al citosol de proteínas mal plegadas para que sean degradadas) y activa ASK1 (proteína involucrada en la apoptosis). Además, interacciona con RAC1 que activa NOX y lleva al aumento de la producción de radicales superóxido y a su liberación al espacio extracelular **(38,39)**

*La **SOD1** es la proteína más estudiada en la enfermedad. Su función fisiológica principal es proteger las células del daño oxidativo al metabolizar los radicales superóxido, pero está implicada en la patología de la ELA a través de la excitotoxicidad, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, la axonopatía, y el tráfico endosomal.*

2.6.2 - Disfunción mitocondrial

Las mitocondrias son organelas vinculadas a varias funciones celulares importantes:

- Producción de energía
- Regulación del calcio intracelular
- Regulación de la apoptosis

Tanto en pacientes con ELAe, como en ratones transgénicos *SOD1* y en modelos celulares, se encontraron anomalías en la bioquímica y morfología de las mitocondrias **(32,40–48)**. Lo mismo sucede con modelos celulares de TARDBP donde el gen está mutado y sobre-expresado, tales como los cultivos primarios de neuronas motoras aisladas de embriones de ratón. En estos casos también se observa que la morfología de las mitocondrias está alterada **(49)**.

La *SOD1* normal y su chaperona CCS, se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria. En cambio, las *SOD1* mutadas y por consiguiente mal plegadas, no solo se encuentran en el espacio intermembrana sino también en la membrana externa y la matriz mitocondrial **(43)**. La presencia de estas proteínas anómalas, causa daños múltiples en las mitocondrias, a saber: pérdida del potencial de membrana, desacople de la cadena respiratoria, pérdida de la homeostasis redox y disminución de la producción de ATP **(43)**.

Los modelos murinos con *SOD1* mutada presentan agregados proteicos que impiden la importación de proteínas y la producción de energía. Las mitocondrias no regulan el calcio (lo cual potencia la excitotoxicidad), se produce una alteración del intercambio de calcio con el retículo endoplasmático, se activan caspasas y se induce

la apoptosis, se observan alteraciones morfológicas y disminución de la cantidad de mitocondrias en los axones distales **(43,50,51)**.

Se encontraron también niveles elevados de ADN mitocondrial mutado, bajos niveles generales de ADN mitocondrial y baja actividad en los complejos I+III, II+III y IV de la cadena respiratoria, en la médula de pacientes con ELA (52,53). Por el contrario, las mitocondrias no aparecen mayormente dañadas en los músculos de los afectados en las fases iniciales de la ELAe **(54)**.

Las mitocondrias son abundantes en las áreas donde existe una demanda intensa de ATP, como en los conos de los axones, los nodos de Ranvier y los terminales sinápticos. Su localización subcelular está determinada por las necesidades fisiológicas, y puede cambiar rápidamente. Su morfología, distribución y actividad está determinada por los procesos de fusión y fisión mitocondrial. Un desequilibrio entre estos dos procesos genera fragmentación o elongación de las mitocondrias. Por lo tanto, es lógico especular que la morfología, la función metabólica, el potencial de membrana, el transporte axonal y la fisión-fusión mitocondrial son interdependientes **(43)**.

Generalmente cuando las células están expuestas a estrés, la fusión permite la formación de una red en la que los componentes mitocondriales se mezclan para compensar el contenido de las mitocondrias dañadas. La fisión, por el contrario, ayuda a crear nuevas mitocondrias sanas que reemplazan aquellas imposibles de recuperar **(55)**.

La fisión mitocondrial en mamíferos está determinada por la acción de la proteína DLP1 (también conocida como Drp1), y los factores Fis1, Mff, MiD49 y MiD51. En cambio, el proceso de fusión mitocondrial está determinado por 3 proteínas GTPasas: las Mitofusinas 1 y 2 (Mfn1 y Mfn2) localizadas en la membrana externa mitocondrial, y la proteína de atrofia óptica 1 (OPA1) localizada en el espacio intermembrana **(43,55)**.

La delección de Mfn1 y Mfn2 impide la fusión mitocondrial, induce una alta fragmentación e impide la generación de túbulos mitocondriales. Además, su falta permite la aparición de defectos severos que incluyen la disminución del potencial de membrana y la disminución de la respiración celular. La mutación de Mfn2 causa una neuropatía llamada enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y las mutaciones en OPA1 causa la forma más común de atrofia óptica hereditaria. Los mutantes Drp1 tienen inhibida la división mitocondrial, lo cual los lleva a presentar redes muy complejas de túbulos mitocondriales interconectados. Por último, la sobre-expresión de Fis1 genera fragmentación mitocondrial, liberación de citocromo c y apoptosis **(43)**.

2.6.3 - Neuroinflamación y contribución a la patología de células no neuronales

Los procesos inflamatorios y las células no neuronales podrían también desempeñar un papel en la patogénesis de la ELA **(56,57)**.

La microglía y las células dendríticas se activan tanto en los modelos murinos de ELA-SOD1 como en pacientes humanos. Ambos tipos celulares producen citoquinas inflamatorias (Interleucinas, COX-2, TNF- α y MCP1) que aparecen reguladas positivamente en el líquido cefalorraquídeo y muestras de médula de

pacientes con ELA o modelos *in vitro*. Secundariamente a esta activación se produce una activación de los astrocitos **(32,58)**.

A pesar de las evidencias, los tratamientos inmunomoduladores no han conseguido demostrar aún actuar como agentes neuroprotectores en los ensayos clínicos.

Los astrocitos representan el tipo celular más abundante en el SNC. Se trata de una población muy heterogénea que tiene múltiples funciones: son reservorios de glucógeno, participan en el control de la homeostasis iónica y metabólica, y en el control global y regional del flujo sanguíneo cerebral en respuesta a la actividad neuronal. También juegan un papel importante en el sistema de defensa del cerebro, determinando la vulnerabilidad de las neuronas a las agresiones medioambientales. Influyen la excitabilidad neuronal al remover neurotransmisores (por ejemplo: glutamato) y participan en la sinapsis junto a los axones y dendritas de las neuronas participantes **(58,59)**.

En los pacientes con ELA, la astrogliosis reactiva ocurre de forma más difusa que la microgliosis. Se encuentra tanto en las zonas de afectación de neuronas superiores como de las inferiores. En los estadios finales de la enfermedad también aparece en zonas corticales, posiblemente debido al estrés ocasionado por los largos períodos de hipoxia que sufren los pacientes terminales. Los astrocitos reactivos tienen un aumento de la inmunoreactividad a GFAP y a la proteína de unión al calcio S100 β , y expresan marcadores inflamatorios (COX-2, iNOS y NOS neuronal). El incremento de estos astrocitos es notable en la sustancia gris del asta ventral de la médula, donde normalmente expresan bajos niveles de GFAP **(59)**. En el ratón SOD1-G93A, la activación de los astrocitos ocurre al mismo tiempo que disminuye el número de motoneuronas **(58)**.

La evolución de la ELA puede definirse en dos etapas:

- Una fase temprana en la que predominan mecanismos de neuroprotección compensatorios
- Una fase posterior en la que aparece neurotoxicidad

Durante las fases iniciales, se activa el sistema inmune del SNC con la glía y las células T (especialmente la macrófagos M2/microglía y los T auxiliares 2). Luego, cuando evoluciona la enfermedad, se evidencia y se agudiza el daño en las motoneuronas, aparecen en el escenario principalmente los macrófagos M1/microglía y las células T pro-inflamatorias. Finalmente, los procesos neurotóxicos son los que predominan **(58)**.

La astrogliosis puede tener una función beneficiosa, pero depende de la intensidad en que se presenta. Aún no se terminan de comprender las consecuencias fisiológicas de una astrogliosis reactiva moderada, y como una respuesta de este tipo es capaz de revertir un daño en el SNC. Pero por ejemplo, se sugiere que es capaz de retrasar la muerte de motoneuronas. Por el contrario, su persistencia implicaría la liberación de especies tóxicas con eventuales efectos perniciosos sobre las células circundantes **(56)**.

Aspectos vinculados al objetivo de la tesis:

- 9 – Enzimas diana del Inhibidor VP1.15: GSK-3 y PDE-7
- 10 – Moléculas diana reguladas por GSK-3 y PDE-7: CREB, β -catenina y AMPc
- 11 – El Inhibidor VP1.15
- 12 – El modelo utilizado de ratón SOD1-G93A
- 13 – Pruebas diagnósticas y de evolución de la enfermedad en ratones y humanos

2.9.1 - Glucógeno Sintasa Quinasa-3 (GSK-3)

La GSK-3 debe su nombre a que inicialmente fué vinculada a la regulación de la Glucógeno sintasa (GS).

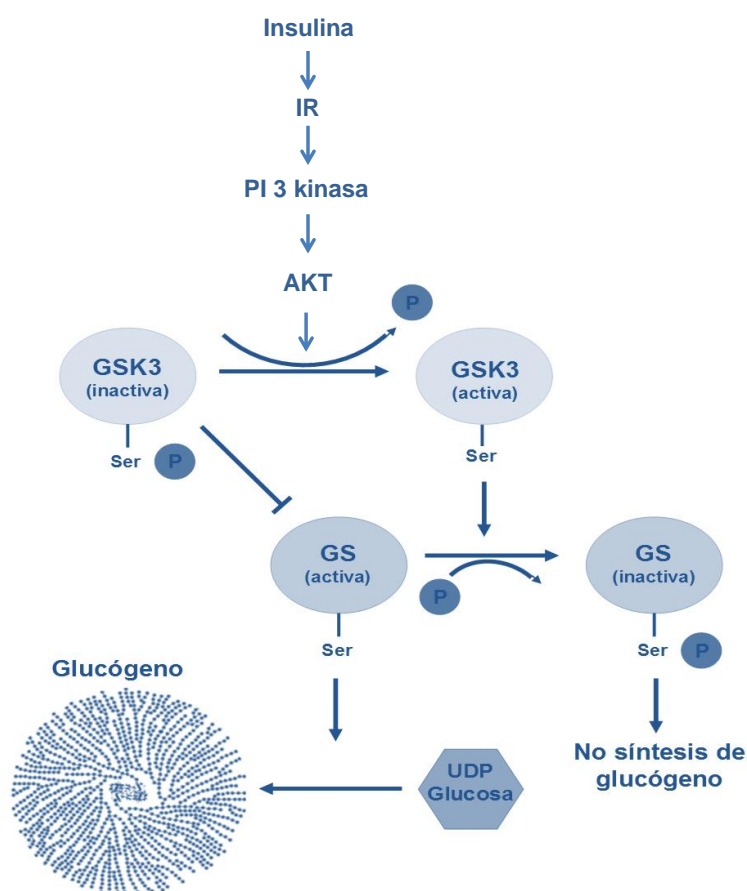


Figura 2.12: Esquema de la reacción de GSK-3 frente a la regulación de la síntesis de glucógeno

Ante la estimulación con Insulina, la GSK3 se inactiva por fosforilación mediante un mecanismo dependiente de la PI-3-quinasa y la proteína quinasa B (PKB). Constitutivamente GSK3 está activa, GS fosforilada y no hay síntesis de Glucógeno – **Figura 2.12.**

GSK-3 presenta dos isoformas codificadas por genes diferentes: GSK-3 α (solo en vertebrados) y GSK-3 β (altamente conservada en todo el reino animal). Las proteínas resultantes presentan un tamaño de 51 kDa y de 47 kDa respectivamente. Esta diferencia se debe a que el N-terminal de la GSK-3 α presenta un dominio rico en glicina que está ausente en la GSK-3 β . Ambas isoformas poseen un dominio catalítico con 98% de homología mientras que difieren en el extremo C-terminal con solo un 36% de identidad aminoacídica (60).

GSK-3 se expresa de forma ubicua tanto a nivel de ARN como de proteína pero es particularmente abundante en el cerebro (rata, ratón y humano)

2.9.1.2 – Función y regulación de GSK-3

Actualmente se sabe que existen más de 40 proteínas capaces de ser fosforiladas por GSK-3, por lo tanto su actividad debe ser cuidadosamente controlada – **Tabla 2.4**. Su regulación se realiza mediante una combinación de estrategias: interacción con otras proteínas, localización celular y fosforilación.

Tabla 2.4: Sustratos posibles de GSK-3. Produce efectos distintos: Incremento o inhibición de la actividad, unión a la proteína diana, inducción de la degradación y determinación de la localización celular entre otros
Extraído de “The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling” – Grimes C & Jope R – Progress in Neurobiology 65 (2001) 391-426

Proteínas del metabolismo y de señalización	Proteínas estructurales	Factores de transcripción
Acetil-CoA-carboxilasa	DF3/MUC	AP-1 (fam Jun)
APP	Kinesina (LC)	B-catenina
APC	KRP	C/EBP
ATP citrato liasa	MAP1B	CREB
Axina	MAP2	GATA4
Ciclina D1	NCAM	Receptor glucocorticoide
Ciclina E	Neurofilamentos	HIF-1
Cubitus interruptus	Nineina	HSF-1
eIF2B		Mash-1
GS		MITF
hnRNP		c-Myb
I-2		c-Myc
IRS-1		NeuroD
Nucleoporina p62		NFAT
P21		NF- κ B (p65 y p105)
PKA		Notch
PP-1		P53
Proteína básica de mielina		
PS-1		
PDH		
Receptor NGF		

2.9.1.2.1 - Regulación por fosforilación

La inhibición de GSK-3 se realiza por fosforilación de una Serina N-terminal: Ser9 en el caso de GSK-3 β y Ser21 en GSK-3 α . Estas serinas son fosforiladas por varias quinasas, entre las que se encuentran Akt, la proteína quinasa A (PKA), la proteína quinasa C (PKC) y p90rsk (61).

Muchas vías de señalización contribuyen a la modulación de la actividad de GSK-3 pero esto no implica que la totalidad de la enzima presente en la célula se vea afectada. Esto se debe a que las proteínas de andamiaje restringen las interacciones entre quinasas, y tanto éstas como GSK-3 tienen ubicaciones intracelulares particulares (61).

GSK-3 se activa por la fosforilación de Tyr216 en GSK-3 β y Tyr279 en GSK-3 α . Esto ocurre por autofosforilación o por la acción de otras tirosina quinasas (61).

El efecto de GSK-3 sobre sus sustratos también está regulado por el estado de fosforilación de los mismos, que en general deben estar pre-fosforilados (imprimados) para que GSK-3 pueda actuar sobre ellos (61).

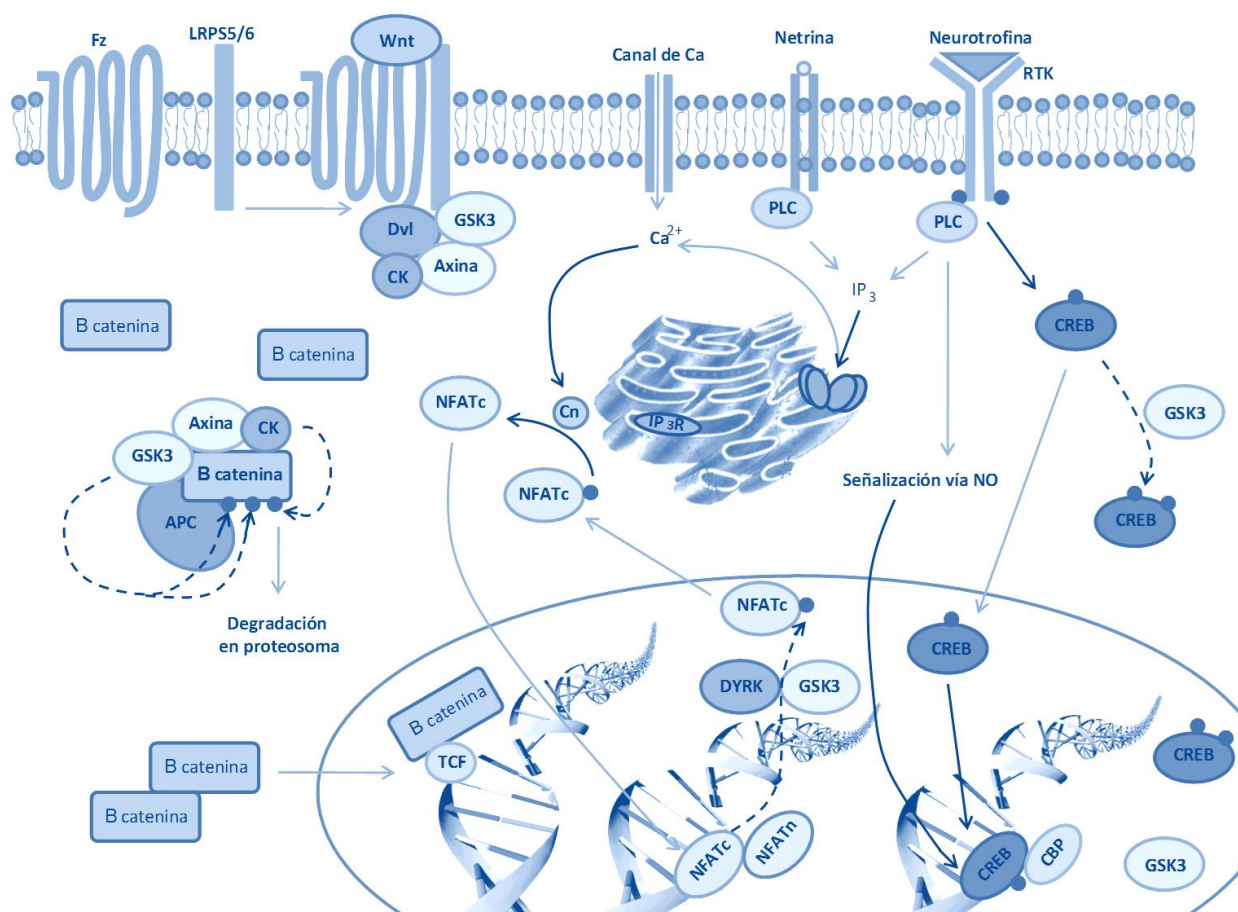


Figura 2.13: Participación de GSK-3 en las reacciones vinculadas a Wnt

2.9.1.2.2 - Regulación de GSK-3 mediante localización intracelular

GSK-3 es principalmente citosólica pero está presente también en núcleo y mitocondria donde se la encuentra principalmente en forma activada (61).

La GSK-3 nuclear actúa sobre factores de transcripción, y por lo tanto regula la expresión de muchos genes. Su nivel fluctúa de acuerdo a señales intracelulares siendo especialmente alto durante la fase S del ciclo celular y la apoptosis (61).

2.9.1.2.3 - Regulación de GSK-3 mediante proteínas de unión

La regulación de GSK-3 está determinada por su interacción con múltiples proteínas y la formación de complejos.

Una de las rutas mejor caracterizada en la que participa GSK-3 es la vía canónica de Wnt que controla la acción de β -catenina – **Figura 2.13**.

En ausencia de estímulo, la axina se une a GSK3, a la caseína quinasa I, a la β -catenina y otras proteínas (61).

Esto permite que la caseína quinasa I fosforile a la β -catenina (en su residuo Ser45) generando un sitio destinado a que asimismo GSK-3 la fosforile en Thr41, Ser37 y Ser33 y promueva su degradación (61).

En cambio ante la estimulación de Wnt se activa DVL, que, junto a la proteína de unión Frat y la GSK-3, facilitan la liberación de la axina del complejo proteico, disminuyendo la fosforilación de β -catenina, su acumulación y activación (61).

Este es un ejemplo clásico de cómo proteínas unidas a GSK-3 regulan su acción hacia sustratos individuales. Aún no queda claro si dichos complejos multiproteicos pueden utilizarse para regular la especificidad de GSK-3 en otras vías.

Los complejos proteicos también regulan las acciones de GSK-3 dentro de las organelas. Por ejemplo, la unión de Frat-1 a GSK-3 facilita su exportación nuclear.

La presencia de otras proteínas de la vía de señalización de Wnt en el núcleo, tales como axina, APC y DVL, sugiere que éstas podrían regular la GSK-3 nuclear, aunque esto aún no se ha investigado (61).

La proteína supresora de tumores p53, que está mutada en muchos cánceres humanos, se une directamente a la GSK-3 nuclear. Esta asociación activa GSK-3, promueve la transcripción de p53 y su acción anti-apoptótica, aunque el mecanismo implicado todavía no se ha dilucidado (61).

En la mitocondria, los niveles de p53 aumentan durante ciertas formas de apoptosis, y el complejo p53 – GSK-3 β se une dentro de la mitocondria. El resultado de esta interacción se desconoce, pero podría facilitar la apoptosis debido a que la inhibición de GSK-3 atenúa la acción de p53, se libera citocromo C de la mitocondria y se activan las caspasas (61).

2.9.1.3 - GSK-3 regula la arquitectura celular y la motilidad

La extensión y retracción de las neuritas, que son procesos cruciales en el desarrollo y regulación del sistema nervioso, están regulados por GSK-3. Para el correcto crecimiento axonal, los eventos de orientación, extensión y retracción deben estar temporal y espacialmente coordinados (62,63).

GSK-3 se mantiene inactiva en el borde delantero de los conos de crecimiento, lo que sugiere que en estado activo, la enzima inhibe la extensión del cono. Al inactivar experimentalmente GSK-3 en neuronas granulares de cerebelo se produce la expansión del cono de crecimiento, la propagación axonal y el aumento de la

ramificación. La inhibición de GSK-3 es también esencial para el crecimiento del cono astrocítico, la extensión y la motilidad. Esto está mediado por un complejo formado por Cdc42, PAR6 y la proteína quinasa Cz. En cambio, tanto la semaforina 3A como el ácido lisofosfatídico activan GSK-3, y esta interacción provoca el colapso del cono y la retracción de las neuritas. Estos estudios demuestran que la inactivación y la activación de GSK-3 promueven el crecimiento y retracción de las neuritas respectivamente: procesos clave que regulan la dinámica del crecimiento de neuronas y astrocitos y los eventos de remodelación **(61)**.

Los microtúbulos son proteínas filamentosas del citoesqueleto cruciales para mantener la estructura, la organización y la motilidad celular. Las proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs) juegan un papel central en la regulación de la función de los microtúbulos. Varias MAPs, como Tau y MAP1B son fosforiladas por GSK3, que regula su unión a los microtúbulos regulando su dinámica. GSK3 también fosforila las cadenas ligeras de quinesina, una proteína responsable de transportar carga (como son las proteínas, las vesículas y los orgánulos) a lo largo de los microtúbulos a destinos específicos; la fosforilación facilita la liberación de la carga a su destino **(61,64)**.

La familia de las quinesinas también regula la acción de los microtúbulos durante la mitosis. Así, la inhibición de GSK3 resulta en defectos en el huso mitótico y la orientación inadecuada de cromosomas **(61)**.

Por lo anteriormente mencionado, la regulación de la actividad de GSK3 es esencial en la dinámica, arquitectura, transporte y remodelación celular **(64)**.

2.9.1.4 - Papel de GSK-3 β en la muerte celular neuronal

GSK-3 β , que como se ha dicho antes, se expresa de forma abundante en sistema nervioso, se involucra en los procesos patogénicos tanto de enfermedades neurodegenerativas como en la isquemia cerebro-vascular. Asimismo, cabe aclarar que recientemente se ha propuesto la participación de GSK-3 α en la muerte celular de neuronas **(60,61)**.

En la enfermedad de Alzheimer aparece un aumento anormal de la actividad de GSK-3 β a través de la acción de la proteína beta amiloide. GSK-3 β fosforila a Tau, induce la muerte neuronal y bloquea el transporte axonal mediante un mecanismo dependiente del receptor NMDA que lleva a la retracción de las neuritas **(60)**.

En la enfermedad de Parkinson aparecen los cuerpos de Lewy que son depósitos de una proteína neurotóxica llamada α -Sinucleína. Esta proteína está relacionada con la activación de GSK-3 β , y aun cuando el mecanismo no ha sido suficientemente dilucidado se observa que permite la hiperfosforilación de las proteínas tau **(60)**.

Por último, en las isquemias cerebro-vasculares, se observa que el tratamiento en la fase aguda con inhibidores de GSK-3 β reduce el volumen infartado y mejora la función neuro-conductual. Además, en el estado crónico promueve la remodelación neurovascular y ayuda a superar las secuelas post-isquemia **(60)**.

2.9.1.5 - Papel de GSK-3 β en la Esclerosis Lateral Amiotrófica

GSK-3 β está principalmente localizada en las capas II y III de la corteza frontal y la capa II del hipocampo.

Se encuentra anormalmente incrementada tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* de modelos animales de ELA, y en médula y corteza temporal de pacientes **(60)**.

A estos hallazgos siguen distintos estudios en los cuales se aplicaron inhibidores de GSK-3 β **(60)**:

- La inhibición de GSK-3 β reduce la muerte neuronal en motoneuronas transfectadas con SOD1 humana (G93A o A4V).
- El litio (un conocido inhibidor de la GSK-3 β) es neuroprotector.
- La edad de inicio de la sintomatología, la progresión de la enfermedad y la supervivencia en el modelo murino de ELA (SOD1-G93A) se ven beneficiados por la administración de inhibidores de GSK-3 β .

El efecto neuroprotector de la inhibición de GSK-3 β se explicaría porque se restauran los signos relacionados con la supervivencia (HSTF-1) en detrimento de los de apoptosis (citocromo c), reflejados en la afectación de la mitocondria, la activación de la caspasa 3 y la presencia de formas procesadas de la poli ADP ribosa polimerasa (PARP: familia de proteínas implicadas en los procesos de reparación del ADN y la apoptosis); y por la disminución de los signos relacionados con la inflamación (Ciclooxigenasa-2 y la molécula de adhesión intercelular 2 (IL-2) **(60)**.

De todas formas hasta la fecha no se sabe fehacientemente por qué GSK-3 β se activa en la enfermedad. Se sugiere que la cadena de señalización por encima de GSK-3 β estaría alterada, y que la disminución de PI3K o Akt provocaría la sobreexpresión de GSK-3 β . No obstante, por el momento no se han encontrado cambios en la ruta PI3K/Akt en las motoneuronas de la médula de ratones modelo de ELA **(60)**.

2.9.1.6 - Inhibidores de GSK-3 β – El litio

Dada la variedad de procesos celulares regulados por GSK-3 β (especialmente a nivel del metabolismo de la glucosa), debe tenerse en cuenta que su inhibición continuada o la presencia en alta concentración de sus inhibidores puede resultar perniciosa.

Por ejemplo, una dosis superior a la óptima llevaría paradójicamente a la muerte de motoneuronas, la administración continua de inhibidores de GSK-3 β permitiría la sobreexpresión de β -catenina, la interacción con factores de transcripción y la des-represión de genes que podrían contribuir a la activación de la proliferación celular y a la aparición de tumores.

Uno de los inhibidores de GSK-3 más asequibles y mejor estudiados es el litio – **Figura 2.14**.

Es empleado con eficacia en el tratamiento del Trastorno bipolar, y aunque no se conoce completamente el mecanismo por el que actúa, existen evidencias *in vitro* e *in vivo* que avalan sus propiedades neuroprotectoras y neurotróficas **(65)**. Dichas propiedades incluyen:

- Protección contra los efectos de la excitotoxicidad: Inhibe a los receptores NMDA, disminuyendo la concentración de calcio intracelular, la activación de JNK, la p38 kinasa y el factor de transcripción AP-1. Además la disminución del calcio intracelular reduce la actividad de la calpaína y su mediación en procesos pro-apoptóticos dependiente de la Cdk5/p25 quinasa.
- Inhibición de GSK-3 y estabilización de β -catenina: Constitutivamente GSK-3 está activa y es dependiente de ATP y magnesio. El litio es un inhibidor competitivo del magnesio y lleva a la GSK-3 a inactivarse, pero también aumenta los niveles de las formas fosforiladas de GSK-3 (Ser 21 para GSK-3 α , y Ser 9 para GSK-3 β) de forma indirecta (aumenta la actividad de PKA, PKC y AKT, e inhibe PP-1). El resultado es que con GSK-3 inhibida, los niveles de β -catenina en el citoplasma aumentan y se trasloca más fácilmente al núcleo.

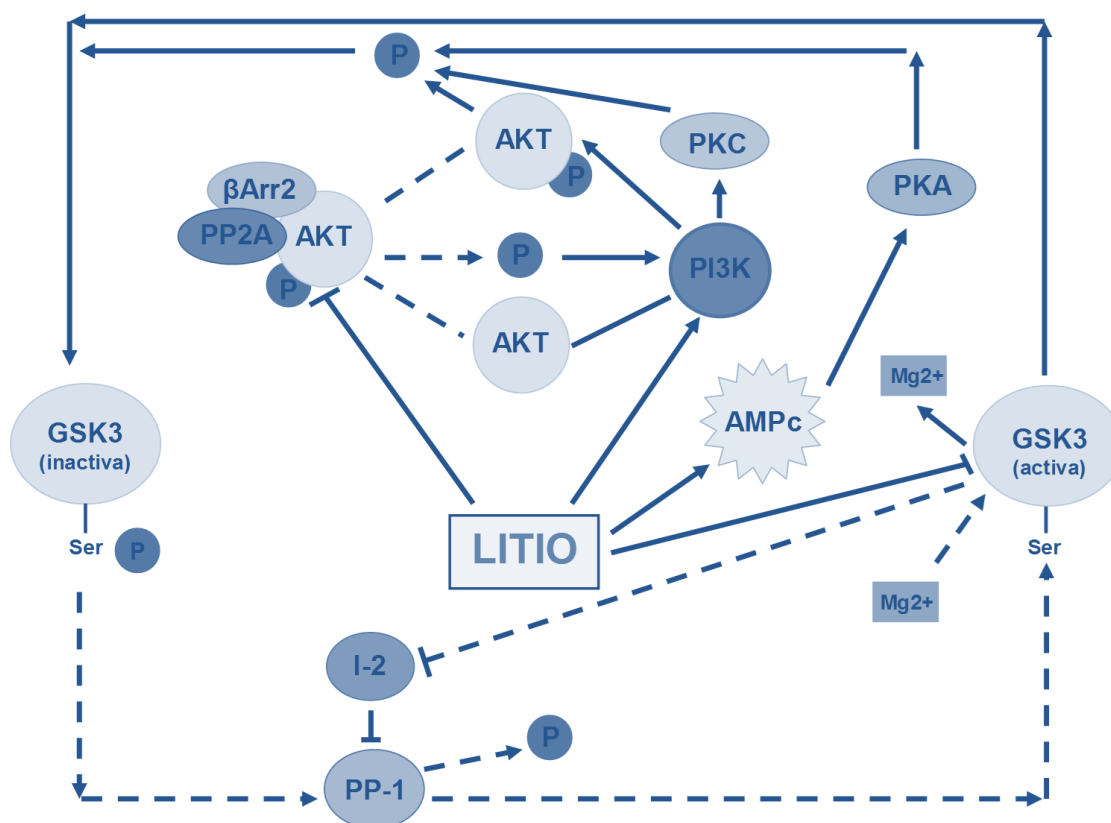


Figura 2.14: Esquema de acción del litio, inhibidor no selectivo de GSK-3, y su relación dentro de la red de reacciones vinculadas a GSK-3

- Inducción de moléculas de supervivencia en el cerebro: Aumenta los niveles de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica), inhibiendo la liberación de citocromo C. Aumenta los niveles de BDNF y de VEGF y los de las HSPs (especialmente HSP70)
- Inducción de la autofagia: La inhibición de inositol mono fosfato y de los transportadores de inositol, inducen los procesos autofágicos. El litio

disminuye los niveles de inositol libre y de IP3, con lo cual favorece que este proceso ocurra.

El litio ha sido empleado en varios ensayos preclínicos sobre modelos de ELA, de infarto, Síndrome X Frágil, Huntington, Alzheimer y Parkinson **(65,66)**.

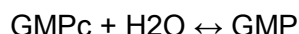
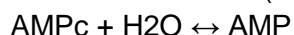
Su efecto en ELA es controvertido.

Combinado con valproato retrasó la aparición de síntomas, disminuyó los valores de alteración neurológica y prolongó la supervivencia en ratones, respecto al tratamiento con administración única de cualquiera de los dos fármacos **(67)**. Lo mismo sucedió cuando en un ensayo clínico se cotrató con riluzol a un grupo aleatorizado de pacientes **(68)**. Los estudios posteriores no encontraron mayores beneficios en su uso, ni en modelos animales ni en humanos, y de hecho los ensayos clínicos con Litio fueron suspendidos por no mejorar la supervivencia de los pacientes **(69–71)**. Actualmente esta posición está siendo criticada fundamentalmente por cuestiones metodológicas y de diseño en los ensayos entre las cuales está el hecho de que los niveles plasmáticos de litio alcanzados en los ensayos clínicos que resultaron negativos, no superaron los valores terapéuticos aplicados en el trastorno bipolar (0,4 – 0,8 meq/L vs 0,6 – 1,5 meq/L) **(72,73)**.

2.9.2 - AMPc y Fosfodiesterasas

El 3´- 5´-adenosina monofosfato cíclico (AMPc) es un mensajero secundario que participa en una gran variedad de rutas celulares tales como la transcripción de genes, la activación de canales iónicos, la biosíntesis y liberación de neurotransmisores, la facilitación y potenciación de la sinapsis, y la supervivencia neuronal.

Los niveles intracelulares del AMPc están regulados por dos enzimas: la Adenilato ciclasa que lo sintetiza y las Fosfodiesterasas (PDE) que catalizan la hidrólisis de 3´, 5´ - nucleótidos cíclicos en 5´- nucleósidos monofosfato (AMPc y GMPc) **(74)**.



Existen al menos 11 subfamilias de PDEs, clasificadas según especificidad al sustrato, los requerimientos de cofactores y la inhibición selectiva por diferentes compuestos. De ellas, PDE1, PDE4, PDE7 y PDE10 se expresan en cerebro **(75,76)**.

Los mayores niveles de expresión (ARNm) de PDE7a en humano se encuentran en bazo, músculo esquelético y corazón. PDE7b es dominante en Sistema Nervioso Central (SNC), especialmente en caudado, nucleus accumbens, corteza e hipocampo. En cerebro de rata se observa que a nivel de ARNm, PDE7b se expresa preferentemente en neuronas ubicadas en bulbo olfatorio, islas de Calleja, giro dentado, caudado-putamen y el núcleo talámico. También, aunque en menor medida, en corteza, células de Purkinje del cerebelo y área postrema. La mayoría de las neuronas del estriado y el bulbo olfatorio que expresan esta fosfodiesterasa son de tipo GABAérgico pero en el núcleo talámico y en el giro dentado son glutamatérgicas **(77) – Figura 2.15**. La PDE4 es la principal fosfodiesterasa con actividad hidrolítica de AMPc en músculo, pero aunque en menor proporción también lo hace la PDE7 (estudios con RT-PCR así lo han demostrado) **(78)**.

La concentración intracelular de nucleótidos cíclicos se regula de forma compleja: Una misma célula puede expresar varias PDEs diferentes y su naturaleza y localización determina el nivel local de AMPc o GMPc **(79,80)**. Las PDEs se regulan no sólo a nivel genético, sino también por diversos mecanismos bioquímicos incluyendo la fosforilación y desfosforilación, la unión alostérica de GMPc o AMPc, la unión de Ca^{2+} /calmodulina, y por diversas interacciones proteína-proteína **(79,80)**.

Se cree que las PDEs podrían modular la dispersión intracelular, la amplitud, y la duración temporal de la concentración local de nucleótidos cíclicos en la célula. Algunas PDEs funcionarían sólo para mantener esa “nube” y evitar que se extienda a áreas inapropiadas de la célula, mientras que otras regularían el acceso local de AMPc o GMPc a receptores específicos (a menudo localizados en determinadas zonas citoplasmáticas) **(79–82)**.

La red de señalización celular mediada por AMPc, está organizada formando complejos multi-proteicos, cuyo papel esencial es anclar a PKA en las proximidades de sus sustratos y asegurar una fosforilación preferencial. Estas proteínas no solo se unen a PKA si no también a las PDEs **(83)**, que podrían usar los cambios alostéricos

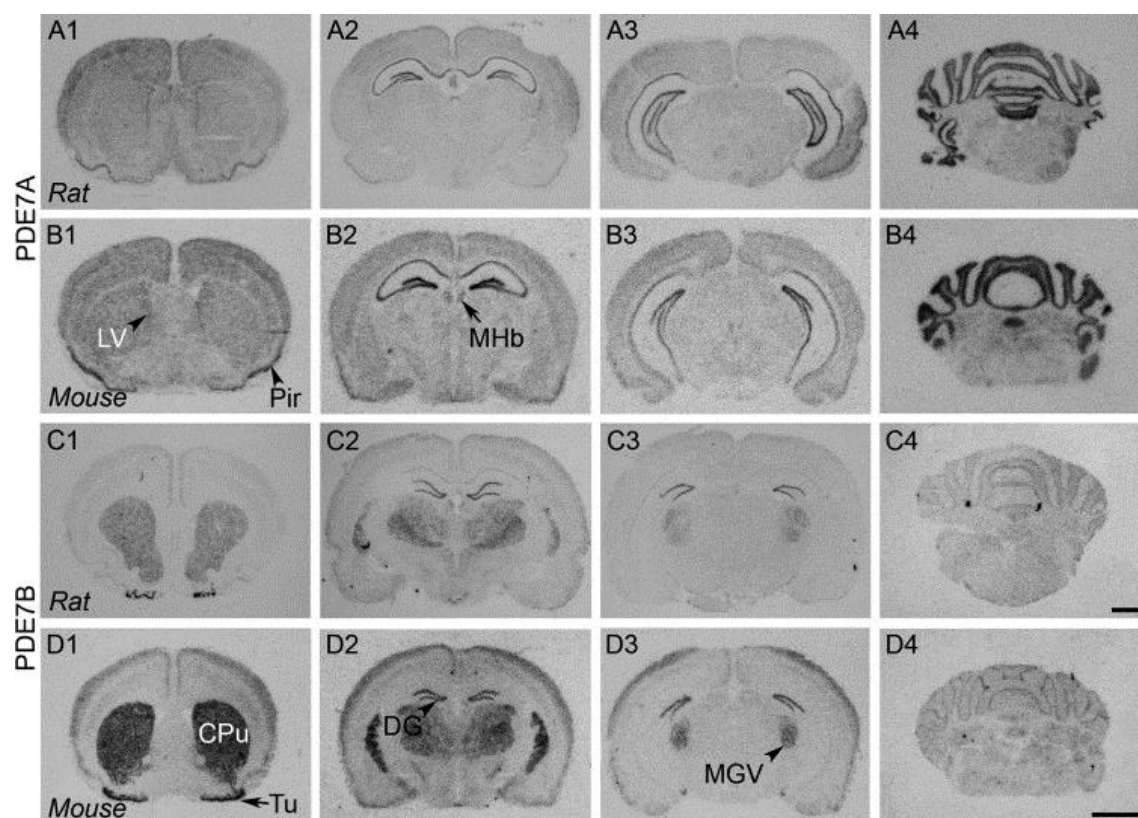


Figura 2.15: Expresión de ARNm de PDE-7b en cerebro de rata.

Extraído de “ Comparison of cAMP-specific phosphodiesterase mRNAs distribution in mouse and rat brain” - Johansson EM, Reyes-Irisarri E & Mengod G – Neuroscience Letters 525(2012)1-6

CPu: Caudado-putamen

DG: Giro dentado

LV: Ventrículo lateral

MGV: Núcleo genicular medial

MHb: Núcleo habenular medial

Pir: Corteza piriforme

producidos por la unión a los nucleótidos cíclicos para alterar las interacciones entre proteínas (79,80).

El cerebro es una estructura que ha evolucionado para especializarse en la comunicación intercelular y como resultado es probable que sea el órgano en el que la regulación de las rutas de señalización sea más compleja.

La respuesta de una neurona individual puede ser el resultado de la integración de miles de señales aferentes. Al responder a una actividad en curso, dicha neurona debe ser capaz de ajustar su capacidad para la señalización y el mantenimiento de sus necesidades metabólicas. Parte del mecanismo para hacer frente a este requisito es la expresión diferencial y la localización de las PDE en todo el cerebro. De esta forma puede controlar diferentes procesos fisiológicos y cascadas de señalización.

2.9.2.1 - Las fosfodiesterasas como agentes terapéuticos

Poco después del descubrimiento de las PDEs, se encontró que la cafeína es un eficaz inhibidor de su actividad. Desde entonces aparecieron muchos inhibidores no selectivos de la actividad fosfodiesterasa (incluyendo el análogo de cafeína, la teofilina) que se utilizan como fármacos (84,85).

La mayoría de estos primeros inhibidores de PDEs tienen un índice terapéutico muy estrecho, debido fundamentalmente a que son capaces de inhibir a todas o muchas de las isoformas de PDE y ejerciendo su acción en la totalidad o en la mayoría de los tejidos (80).

Cada una de las isoformas de las PDEs se expresa de forma diferencial en los tejidos de mamíferos, y pueden tener una arquitectura única en el sitio activo. Además las PDEs están estrechamente conectadas a diferentes funciones fisiológicas y por lo tanto se asume también que a diferentes condiciones patológicas. Son estas razones las que obligan a desarrollar inhibidores selectivos que eviten causar efectos secundarios no específicos. El éxito terapéutico del sildenafil (Viagra), por ejemplo, como inhibidor selectivo de la PDE5 ha demostrado apoyar este concepto (80).

Las PDEs resultan buenos objetivos terapéuticos puesto que la concentración intracelular de sus sustratos (cAMP y cGMP) se encuentra entre 1 μ M y 10 μ M, y esto significa que un inhibidor competitivo no tendría que desplazar niveles muy altos de sustrato endógeno para ser eficaz.

2.9.2.2 - Terapéutica de los inhibidores de PDE en el SNC

El desarrollo de inhibidores potentes y específicos de PDEs está condicionado porque solo se disponen las estructuras cristalinas de los dominios catalíticos de PDE1B, PDE3B, PDE4B, PDE4D, PDE5, PDE7, PDE9 y PDE10 (86).

Aun así, para el tratamiento de los trastornos que afectan el SNC, estos posibles fármacos deberían ser capaces de cruzar fácilmente la barrera hemato-encefálica (86).

Esta barrera comprende dos componentes:

- uniones estrechas endoteliales (comprimen los lechos capilares de la vasculatura del SNC y limitan la difusión de pequeñas moléculas al parénquima del cerebro)
- proteínas transportadoras (presentes en las células endoteliales, bombean activamente pequeñas moléculas fuera del cerebro)

Existen dos características moleculares significativamente determinantes que facilitan el traspaso de la barrera hemato-encefálica (86):

- alta lipofiliidad (CLOGP entre 2 y 4)
- área de superficie polar (menor a 80-90Å)
- bajo tamaño molecular o masa (menor a 400 Da)

Hay pocos datos publicados sobre la penetrabilidad al SNC de los inhibidores de PDEs.

La principal característica molecular que promovería interacciones de alta afinidad con los sitios activos de las PDEs es la conservación de un bolsillo hidrofóbico (abrazadera P) implicado en la orientación del anillo de purina que interacciona con un residuo de glutamina crucial para el mecanismo catalítico de las PDEs (86).

Por lo tanto, el conocimiento de la estructura del sitio activo con el inhibidor, y las características requeridas para llegar al SNC, es fundamental para sintetizar compuestos selectivos potentes que fácilmente accedan al cerebro (86).

*El programa **CLOGP**, estima el valor del coeficiente de reparto octanol-agua (**Kow**) para compuestos orgánicos. Su **valor** está entre **0 y 9**.*

2.9.2.3 - PDE7 como diana para las enfermedades del SNC

La familia PDE7 se compone de dos genes (A y B) que codifican enzimas AMPc-específicas de alta afinidad e insensibles al Rolipram (un inhibidor específico de PDE-4, utilizado como herramienta de investigación en la industria farmacológica).

Se ha comprobado que en cerebro de rata y en numerosos tejidos periféricos, los niveles de PDE7A y PDE7B son elevados respecto a su expresión génica (la distribución de estas enzimas a nivel protéico no ha sido aún publicada). Específicamente en cerebro, la expresión de PDE7A está aumentada en el bulbo olfativo y el tubérculo, el hipocampo, las células granulares del dentado y el núcleo del tallo (87).

Los niveles más altos de ARNm de PDE7B en el cerebro de rata se encuentran en el cerebelo, el complejo estriatal y el giro dentado del hipocampo, así como en el núcleo talámico (87).

En cultivos primarios de neuronas de rata, la expresión de PDE7B se incrementa después de la activación del receptor de dopamina D1. El receptor D1 está positivamente relacionado con la adenilatociclasa, lo que sugiere que PDE7B podría estar involucrada en la regulación de la cascada de señalización iniciada por este receptor.

La expresión génica elevada tanto de PDE7A y PDE7B en el cuerpo estriado y el dentado humanos sugieren que la utilización de sus inhibidores selectivos podrían elevar la concentración de AMPc en estas regiones sin que aparezcan algunos de los efectos secundarios observados, por ejemplo, con la inhibición de PDE4 (87).

Se han sintetizado y estudiado varios inhibidores de PDE7, pero sus efectos sobre la función del SNC todavía no se han descrito.

2.9.3 – Papel del AMPc en el SNC

El diseño final del SNC maduro está determinado por una serie de pasos que involucran (88):

- Diferenciación neuronal (polarización y especificación por neurotransmisores)
- Crecimiento de los axones
- Orientación axónica
- Formación de mapas topográficos (desarrollo de interconexiones entre neuronas)
- Refinamiento de las conexiones sinápticas

Cada uno de ellos está regulado por cascadas de señalización en las que intervienen nucleótidos cíclicos.

La maduración de las neuritas y su pasaje a axones o dendritas está determinado por las interacciones locales entre AMPc y GMPc. Altas concentraciones de AMPc y bajas de GMPc, determina la aparición de axones; mientras que si la relación entre ellos es inversa se promueve la dendritogénesis (88).

En las neuronas en desarrollo, la elevación del AMPc y los picos intracelulares de calcio son interdependientes: si la frecuencia de los picos de Ca²⁺ es baja, la neurona se condicionará como inhibitoria; si por el contrario la frecuencia de esos picos es alta, entonces la neurona será excitatoria (88).

Cuando se cultivan células ganglionares de retina, la elongación de los axones depende del incremento de la concentración de AMPc. Este proceso requiere también de la participación del Ca²⁺. Cuando en el cono axónico la relación entre AMPc/GMPc es alta, el axón se orienta a favor de las señales globales de crecimiento. Por el contrario, cuando esta relación es baja, las señales de crecimiento repelen su orientación.

En general, mientras dura la axonogénesis, un incremento en el AMPc se correlaciona con una reducción de la concentración de GMPc. Los mecanismos que subyacen en esta regulación aún no son claros (88).

Respecto a la formación de las uniones neuromusculares, un trabajo reciente demostró que el nivel intracelular de AMPc de las neuronas presinápticas previene la maduración fisiológica y morfológica de las uniones neuromusculares, y que la depleción de Ca²⁺ intracelular anula esta inhibición AMPc dependiente (89).

2.9.3 - CREB: Función y regulación en el Sistema Nervioso Central

CREB (en inglés: cAMP response element binding protein) pertenece a una extensa superfamilia de factores de transcripción caracterizada por dominios bZIP.

Contiene un extremo C-terminal básico que interacciona con el ADN, y un dominio de cremallera de leucinas que facilita su dimerización **(90,91)**.

CREB se une en el ADN a un elemento regulador en cis llamado CRE (en inglés: cAMP response element), que consiste en una secuencia palindrómica TGACGTCA. Esta secuencia consenso puede sufrir variaciones pero en general se mantiene el núcleo CGTCA **(90,91)**.

Mientras que el dominio bZIP facilita la unión al ADN y la dimerización, el resto de la proteína favorece la interacción con coactivadores y otros componentes de la maquinaria de transcripción **(90)**.

CREB α y CREB δ son las isoformas más abundantes de CREB. Contienen un

bZIP con dos dominios ricos en glutamina llamados Q1 y Q2/CAD (en inglés: constitutive active domain) separados por el dominio inducible por quinasa (KID). Estas dos isoformas difieren únicamente en la presencia del dominio α **(90,91)**.

Dentro del dominio KID se encuentra el residuo Ser-133, que cuando es fosforilado permite la unión de un coactivador transcripcional: la proteína de unión a CREB (CBP: CREB binding protein) **(90)**.

Asimismo, CBP se une a CREB a través del dominio KIX. Se cree que la interacción entre KID y KIX es la que desencadena la inducción de la expresión génica **(90)**.

Existen más de 100 genes diana de CREB. Todos ellos presentan uno o más sitios de unión a CRE en sus promotores. La siguiente tabla adjunta algunos de ellos **(91)** –

El dominio bZIP (dominio básico de cremallera de leucinas) está presente en muchas proteínas que funcionan como factores de transcripción.

La región que se une al ADN presenta una serie de aminoácidos básicos (arginina y lisina)

El residuo de Ser-133 es la llave reguladora de la acción de CREB frente a los estímulos extracelulares que debe procesar

Tabla 2.5.

En las neuronas, la fosforilación de CREB ocurre ante una gran variedad de circunstancias, aunque se inician siempre por estímulos externos **(90)**. Esto incluye:

- Factores de crecimiento durante el desarrollo del Sistema Nervioso
- Despolarización y actividad sináptica durante la función normal neuronal
- Respuestas ante hipoxia y estrés por daño neuronal

CREB es por lo tanto un factor general estímulo-inducible, capaz de recibir numerosas influencias externas, procesarlas convenientemente y provocar una respuesta específica.

Cuando CREB está disponible, actúa prioritariamente sobre la regulación de los genes en los que opera. Si está ausente (como sucede en los modelos knock out), son otros factores de transcripción los que suplen su función, puesto que sus genes diana se solapan. **(92,93)**

El residuo Ser-133 de CREB, es fosforilado por una serie de quinasas **(90,94)**:

- Quinasa II Ca²⁺ +/- CaM dependiente y Quinasa IV Ca²⁺ +/- CaM dependiente
- Proteína quinasa A
- Proteína quinasa C
- Quinasa activada por mitógenos y estrés
- Quinasa ribosomal S6
- AKT
- MAPKAP quinasa 2

Estas quinasas se accionan en respuesta a una variedad de estímulos incluyendo el aumento de Ca²⁺ + y AMPc intracelular. Entonces fosforilan a CREB, ésta se vincula al dominio KIX de CBP y p300, se une al sitio CRE y provoca la transcripción del gen diana **(90)**.

La funcionalidad de CREB también puede ser afectada por una serie de eventos de fosforilación adicionales, que tienen efectos complejos y específicos sobre su trans-activación. Por ejemplo, la fosforilación del residuo Ser-142 por la quinasa II Ca²⁺ +/- CaM dependiente reprime la trans-activación mediante la disociación del dímero de CREB e inhibe el reclutamiento de CBP. Sin embargo, existen estudios en los que se usan anticuerpos fosfo-específicos para CREB en Ser-142 sobre un modelo Knock-in en la posición Ala-142 y observaron que la fosforilación ocurría de una forma dependiente de la actividad y que esto robustecía la expresión génica en SNC **(90)**.

La GSK-3 β fosforila CREB en su Ser-129. Como sucede en la Ser-142, la fosforilación de este sitio puede aumentar o suprimir a CREB y por ende la expresión génica **(90,95)**.

Asimismo, en respuesta al estrés la Proteinquinasa 2 fosforila CREB en Ser-271 y la activa reclutando CBP/p300. Por último, ante un daño en el ADN, la Caseinquinasa fosforila secuencialmente los sitios Ser-108, Ser-111, Ser-114 y Ser-117. Al final, vía la fosforilación mediada por ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated, en inglés) en Ser-121 se separan CREB y CBP **(90)**.

La defosforilación de CREB también se regula de un modo actividad dependiente. Por ejemplo, la defosforilación de CREB en Ser-133 lleva a la represión de la transcripción, mediada por las Fosfatasas de tipo 1 (PP1) y 2^a (PP2A). Como nota, en las neuronas hipocampales, la actividad sináptica puede acarrear periodos largos de fosforilación de CREB vía la inhibición de PP1 **(90)**.

Si bien el proceso de fosforilación de CREB es complicado, hay que agregar que esta proteína también es regulada por procesos de acetilación, ubiquitinación, sumoilación, y glicosilación **(90)**.

Utilizando ratones bitransgénicos con niveles crónicamente alterados de CREB, se observa que el hipocampo degenera tanto si hay un aumento como si hay una disminución de esta proteína. Sin embargo la inhibición sostenida de su función (hecho que ocurre en el modelo de ratón transgénico A-CREB, que expresa una forma dominante de CREB con actividad represora) se asocia con la degeneración oscura de neuronas, mientras que la activación crónica en ratones VP16-CREB (ratones que expresan de forma constitutiva CREB en forma activa) produce muerte celular por excitotoxicidad e inflamación **(90)**.

Por lo tanto es necesario tener cuidado con la duración y la intensidad de una terapéutica basada en CREB. En el cerebro sano, la fosforilación de CREB que se produce en respuesta a la actividad neuronal es transitoria y promueve la expresión de genes específicos en un breve período de tiempo. El bloqueo de esta función tiene efectos dramáticos en la viabilidad neuronal, pero el mantenimiento de niveles muy elevados de actividad de CREB puede ser igualmente devastador (96) – **Figura 2.16.**

Tabla 2.5: lista de genes con secuencias CRE capaces de ser modulados por CREB.

Extraído de “Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system” – Lonze B & Ginty D – *Neuron* (2002) 35, 605-623

Función	Genes con secuencias CRE
Neurotransmisión Péptidos	Acetilcolinesterasa (AChE) – Receptor $\alpha 1$ GABAA, Receptor $\beta 1$ adrenérgico, Cardiotrofina 1(CT-1) – Péptido relacionado con el gen Calcitonina (CGRP) – Colesicistiquinina (CCK) – Cromogranina A – Cromogranina B – Hormona de liberación de Corticotrofina – Dopamina β hidroxilasa (D β H) – Enkefalina – Galanina – Receptor Galanina 1 (GalR1) – Subunidad α de hormona glicoproteica – Receptor de hormona liberadora de Gonadotropina (GnRHR) – Gonadotropina α coriónica humana (h-CG α) – Receptor del péptido liberador de gastrina murina (mGRP-R) – Neurotensina/Neuromedina N (NT/N) – Transportador de Norepinefrina (NET) – Péptido activador de la adenilciclase pituitaria (PACAP) – Preprotaquilina A – Prodinorfina – Proencefalina – Proglucagon – Secretogranina – Secretogranina II – Somatostatina – Receptor de Somatostatina (ss-2) – Receptor sustancia P – Sinapsina I – Tirosinaminotransferasa – Polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) – Vasopresina (AVP) – Transportador de monoaminas vesicular (VMAT) – VGF
Factores de crecimiento Hormonas	Factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) – Factor de crecimiento de fibroblastos 6 (FGF-6) – Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1) – Inhibina α – Leptina c – Factor de crecimiento transformante $\beta 2$ (TGF $\beta 2$) – TrkB –
Estructural	E-Caderina – Fibronectina – ICAM-1 – Neurofilamento de 68 kD (NF-L)
Canales transportadores	Acuaporina-2 (AQP-2) – Regulador de la conductancia en Fibrosis Quística (CFTR) – Transportador de Glucosa-2 (GLUT2) – Canal kw3 K $^{+}$ – Na $^{+}$ /K $^{+}$ ATPasa
Metabolismo	Aritilquilamina N-acetil transferasa (AA-NAT) – Bcl-2 – Ciclooxigenasa-2 (COX-2) – Citocromo C – Glutamina sintetasa (GS) – Hemoxigenasa-1 (HO-1) – Hexoquinasa-2 – HMG CoA sintetasa – Enolasa neurona específica (NSE) – Ornitina decarboxilasa – Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) – Piruvato carboxilasa – Superóxido dismutasa-2 (SOD2) – Enzima conjugada a Ubiquitina – Proteína-1 no acoplada (UCP-1) – Proteína-2 no acoplada (UCP-2) – Proteína-3 no acoplada (UCP-3)
Transcripción	Factor de activación de la transcripción-3 (ATF-3) – C/EBP β – c-FOS – CREB – Egr-1 – ICER- JunD – Krox-20 – mPer-1 – mPer-2 – Nurr-1 – Pit-1 – STAT-3
Transducción de señales	14-3-3-B – Ciclina A – Ciclina D1 – Sintetasa Inducible por óxido nítrico (iNOS) – Neurofibromatosis-1 (NF-1) – Sintetasa de óxido nítrico neuronal (nNOS) – Prostaglandina sintetasa-2 (PGS-2) – Suero y glucocorticoide quinasa Inducible

2.9.3.1 - CREB: Relación con GSK3 y sus inhibidores

Uno de los factores de transcripción que pueden ser regulados por GSK3, es CREB. Su fosforilación en el residuo Ser-133 crea a su vez una señal consenso de fosforilación para GSK3 en la Ser-129. La respuesta funcional a esta modificación ha sido controvertida, pero ya desde 2001 se sabe que la inhibición de GSK-3 en Ser-9 (con Litio y Valproato de Sodio), incrementa la unión de CREB al ADN (95,97,98).

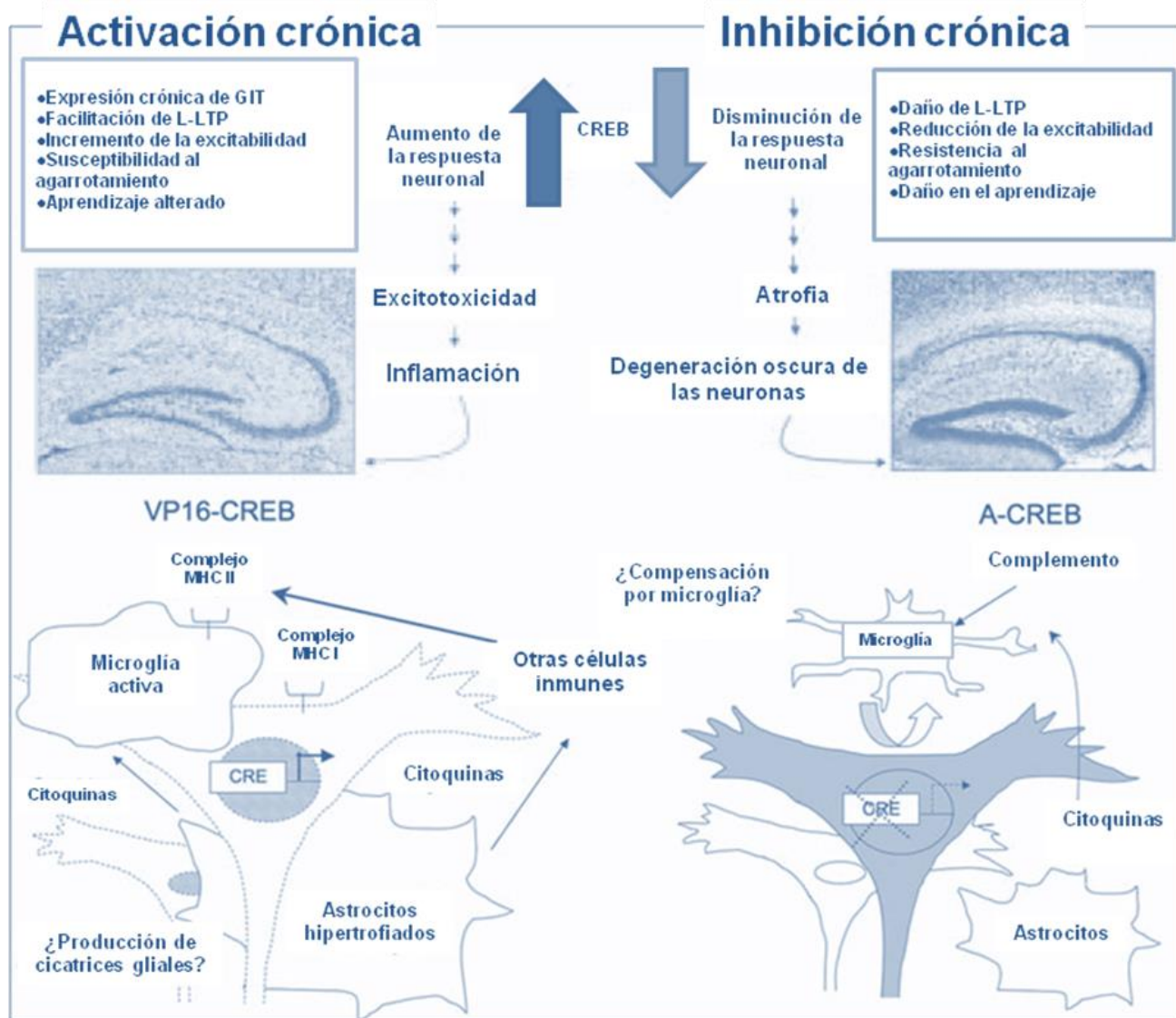


Figura 2.16: Control de la supervivencia y la plasticidad neuronal por CREB.

Extraído de "Ultraestructural and transcriptional profiling of neuropathological misregulation of CREB function" – Valor LM, Jancic D & Barco A – *Cell Death and Differentiation* (2010) 17, 1636-1644

2.9.3.2 - CREB y su relación con la ELA

Las Histona-acetiltransferasas (HATs) alteran la estructura de la cromatina produciendo una regulación de la actividad transcripcional. Una de estas HATs, es CBP, cuyos niveles en el núcleo de las neuronas motoras del modelo de ratón G86R se encuentran disminuidos (99). Cuando se trata a estos ratones con Valproato de sodio, que restaura los niveles de acetilación y de CBP, se inhibe la muerte de las motoneuronas aunque no se impide la destrucción de las uniones neuromusculares, y por lo tanto no se mejora la supervivencia de los animales (100).

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos en el sistema nervioso central de ratones SOD1-G93A sobre CREB y CBP y se encontró que la distribución de neuronas CBP inmunorreactivas no era diferente entre los controles y los ratones transgénicos, mientras que los astrocitos CBP-inmunorreactivos sólo se encontraron en ratones transgénicos. Los astrocitos CBP-inmunorreactivos se detectaron en los núcleos de la médula espinal, el tallo cerebral, el mesencéfalo y el cerebelo. Esto podría sugerir que estas células gliales juegan un papel importante en el desarrollo de la ELA **(101)**.

2.9.4 - Ruta de señalización Wnt y relación con Beta Catenina

La ruta de señalización Wnt es una vía antigua y evolutivamente conservada que constituye uno de los sistemas más importantes al dirigir procesos biológicos tan diversos como **(102)**:

- la determinación del destino celular durante el desarrollo embrionario
- la proliferación celular
- la detención del ciclo celular
- la diferenciación
- la apoptosis
- y la homeostasis tisular

Como resultado, cualquier alteración en la vía de señalización Wnt produce defectos congénitos y multitud de enfermedades, especialmente el cáncer.

Las proteínas Wnt pueden activar la cascada "canónica" de señalización Wnt, en la que la expresión de genes es dependiente de las funciones de la beta-catenina nuclear (fuera del núcleo, la β -catenina desempeña papeles críticos en las interacciones célula-célula y la polarización celular). Pero las proteínas Wnt también pueden activar las llamadas vías "no canónicas", independientes del aumento de la β -catenina nuclear. Estas dos rutas no son sistemas de transducción de señales distintos, por lo cual se cree que existe un equilibrio coordinado entre la β -catenina nuclear transcripcionalmente activa, y la beta-catenina citoplásmica transcripcionalmente inactiva **(102)**.

Hay una gran variedad de proteínas y complejos que median y modulan la cascada de señalización Wnt.

La familia de ligandos Wnt en mamíferos, por ejemplo, se compone de 19 glicoproteínas con dominios hidrofóbicos extracelulares, 10 proteínas Frizzled (Fz) con 7 dominios transmembrana que abarca los receptores LRP y los co-receptores 5 y 6, además de los receptores no clásicos de Wnt (por ejemplo Ryk, Ror) **(102)**.

Los ligandos Wnt accionan sobre una gran variedad de respuestas intracelulares, tanto por la vía de señalización canónica (beta-catenina dependiente) como por la no canónica-(beta catenina independiente) **(102)**.

Básicamente la señalización Wnt/ β -catenina conduce a la regulación de la actividad transcripcional de TCF / LEF ("T-cell factor/lymphoid-enhancer binding factor" en inglés), que dirige procesos tales como la determinación del destino celular, la proliferación y la diferenciación. Pero β -catenina interactúa con muchos otros factores de transcripción, por ejemplo, varios miembros de la familia Sox, FOXO, HIF1 y receptores nucleares, por lo cual su función debe considerarse más compleja **(102)**.

Asimismo la señalización de Wnt/ β -catenina-independiente ha sido asociada preferentemente con el movimiento celular y la organización de los organismos, incluyendo la polaridad, el patrón dorso-ventral y la separación de tejidos (102).

2.9.4.1 - Función de β -catenina y regulación vía GSK-3

Las funciones de β -catenina están mediadas por su interacción con otras proteínas que participan a su vez en procesos muy diferentes, por lo tanto sus niveles citoplasmáticos están muy regulados (103).

La mayoría de la β -catenina está unida a las cadherinas transmembrana formando un complejo conectado a la actina vía la α -catenina. De esta forma constituye parte de las uniones adherentes que permiten el pegado de unas células con otras (103).

La fracción citoplasmática de β -catenina se regula por fosforilación mediante su interacción con GSK-3 α y GSK-3 β , AXIN y APC (103).

Para que β -catenina se active, la forma clásica es que la vía canónica de Wnt inhiba a GSK3 (102,103). La señalización mediante esta vía está involucrada en muchos procesos celulares y en el mantenimiento de la homeostasis tisular, por regulación de la proliferación, la diferenciación, la migración, la estabilidad genética y la apoptosis. También está involucrada en el mantenimiento del estado pluripotencial de las células madre. Se trata de una vía muy conservada en la evolución, y es lógico relacionarla con distintas enfermedades si alguno de los puntos en que ella participa está alterado (104).

2.9.4.2 - Relación de β -catenina en las patologías del Sistema nervioso

Como se mencionó antes, la ruta Wnt/ β -catenina se relacionó inicialmente con el desarrollo. No obstante, algunos de sus genes diana aparecen ahora vinculados con la susceptibilidad a la esquizofrenia y las proteínas que aparecen mutadas en enfermedades neurodegenerativas tienen la habilidad de regular los niveles de β -catenina. Con lo cual, si la desregulación de esta vía lleva a procesos patológicos, entonces debe tener un papel fisiológico importante en el cerebro adulto (103).

En el cocultivo indirecto de astrocitos y neuronas dopaminérgicas, cuando éstas últimas tienen silenciada la β -catenina, se observa una anulación del efecto neuroprotector que los astrocitos intactos tendrían sobre ellas (105).

En las neuronas, los complejos de adhesión cadherina- β -catenina están presentes en las sinapsis. Así, regula el tamaño y la localización de las vesículas por interacción con proteínas presinápticas PDZ, interacciona con algunas moléculas de andamiaje en los sitios postsinápticos e influye sobre la fuerza excitatoria postsináptica (103).

El complejo β -catenina/cadherina juega un importante papel en el aprendizaje y la memoria, como demuestra un estudio en el que la estabilización de β -catenina en el hipocampo de ratones adultos provoca efectos deletéreos en la función cognitiva (106).

En el caso de la Enfermedad de Huntington, la Huntingtina interfiere específicamente con la degradación de β -catenina uniéndose al complejo que la

destruye. Así, la Indometacina (un anti-inflamatorio que disminuye los niveles de β -catenina) tiene un efecto neuroprotector en un modelo neuronal de EH y en el modelo EH de *Drosophila* (107).

Se sabe que la exposición prenatal al etanol causa problemas serios en el neurodesarrollo por inducción de la apoptosis en los progenitores neurales. No se conocen los mecanismos de señalización celular relacionados, pero en embriones de pollo se demostró que el etanol activa CaMKII, lo cual resulta en una señal pro-apoptótica por pérdida de β -catenina activa. La sobreexpresión de los niveles de β -catenina, normalizan la supervivencia celular en presencia de etanol, de la misma forma que lo logra la inhibición de CaMKII (108).

2.9.4.3 - β -catenina y ELA

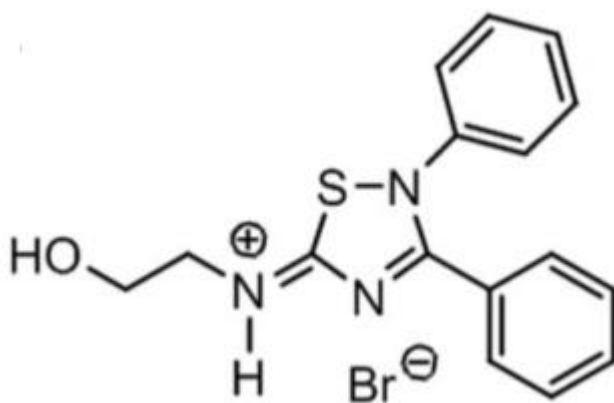
En un modelo *in vitro* de ELA (células NSC34 que expresan la mutación SOD1-G93A), se observó una disminución de la actividad transcripcional asociada a la ruta Wnt/ β -catenina, una disminución de la tasa de proliferación, mayor susceptibilidad a la apoptosis y la fragmentación del Golgi. Como estas células derivan de motoneuronas, resultó interesante comprobar que además dejaban de expresar el marcador motoneuronal Hb9v (109).

En el modelo murino SOD1-G93A se ha visto aumentada la expresión de β -catenina, Ciclina D y Wnt3a en médula (a nivel de ARNm y proteína). Y si bien esta expresión aparece tanto en neuronas como en astrocitos, está aumentada en éstos últimos. En el mismo trabajo se demuestra que la neurodegeneración activa la ruta Wnt/ β -catenina, vinculada a la proliferación glial en la médula de estos ratones (110).

Finalmente, en muestras de tejido nervioso correspondientes a pacientes de ELA con o sin disfunción cognitiva se observó un aumento de la expresión de GSK, GSK-3 β , fosfo GSK-3 y fosfo β -catenina (111).

2.10 - VP1.15: Inhibidor doble de GSK3 y PDE7

VP1.15 es una molécula recientemente sintetizada por el grupo de Ana Martínez en el Instituto de Química médica del CSIC, el cual desarrolló dos familias de compuestos (5-imino-1,2,4-tiadiazoles y quinazolininas) que son inhibidores de las enzimas GSK3 y PDE7.



Dicho inhibidor puede atravesar la barrera hematoencefálica, característica esencial para que un fármaco pueda actuar en el SNC. Tiene un IC₅₀ (μ M)= 1,11 para PDE-7, un IC₅₀ (μ M)= 1,95 para GSK-3 y modos respectivos de interacción alostérica y competitiva frente al sustrato (112) – **Figura 2.17.**

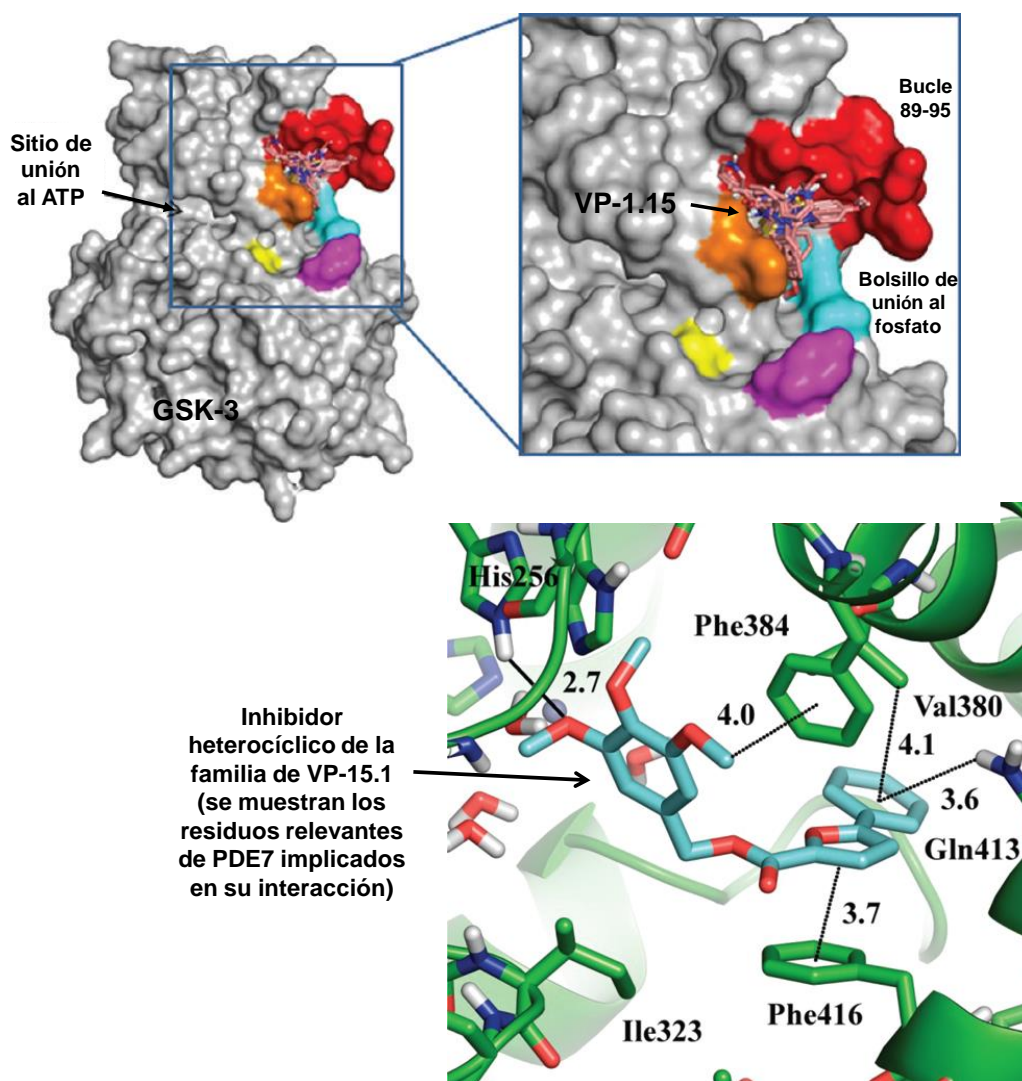


Figura 2.17: Interacción de VP1.15 sobre la superficie de GSK-3 y PDE-7.

Extraído de “5-Imino-1,2,4-Thiadiazokles: First Small Molecules as Substrate Competitive Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase 3” – Palomo V. et Al – J. Med. Chem. (2012) 1645-1661, y “Effect of Phosphodiesterase 7 (PDE7) Inhibitors in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mice. Discovery of a New Chemically Diverse Family of Compounds” – Redondo et Al – J. Med. Chem. (2012), 3274-3284

Además se comprobó mediante cromatografía de afinidad y experimentos de competencia que este inhibidor tiene una alta afinidad por la seroalbúmina, uniéndose a un sitio de unión diferente al usual y no interacciona con la bilirrubina, lo cual lo presenta como un buen candidato a considerar como fármaco (113).

Ha sido empleado con resultados positivos en un modelo murino de esquizofrenia, donde logró mejorar los parámetros cognitivos relacionados con la enfermedad (114).

Otros compuestos relacionados con él, como por ejemplo VP1.14 y S14, también resultaron fármacos eficientes para revertir la sintomatología de modelos

murinos de infarto cerebral y Enfermedad de Alzheimer respectivamente. En el primer caso previno la activación glial y la muerte neuronal, y en el segundo se atenuaron el deterioro comportamental, la deposición de A β en cerebro y la fosforilación de tau **(115,116)**.

Pero fundamentalmente está demostrado que VP1.15 es un potente agente anti-neuroinflamatorio que previene la producción de nitritos en cultivos primarios de astrocitos. Lo hace por inhibición directa e indirecta de GSK-3, puesto que a través del aumento de los niveles intracelulares de AMPc, se activa la Protein kinasa A (PKA) y se consiguen reforzar los niveles de GSK-3 fosforilada en el residuo de Ser9.

Esto también resulta interesante porque desde hace tiempo se sabe que el aumento del AMPc promueve la supervivencia neuronal **(117)**.

2.11 - El ratón SOD1-G93A: modelo de Esclerosis Lateral Amiotrófica

En Julio de 1994, Mark Gurney, publica en Science el artículo “Motor Neuron degeneration in mice that express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase mutation”, en el que se mencionan las características del modelo de ratón más utilizado en la investigación animal de la ELA **(118)**.

En el artículo se menciona que solo uno de los cuatro grupos de ratones transgénicos que expresaban SOD1 humana con la mutación G93A, desarrolló la enfermedad.

La filial 1 (F1) de ese grupo presentó un número de copias del transgen de 18 +/- 2,6; mientras que los demás grupos tuvieron un número de copias menor y no presentaron alteraciones patológicas. Esto indicó que el modelo murino debe necesariamente sobre-expresar el gen SOD1 humano mutado para manifestar una sintomatología semejante a la ELA **(118,119)**.

Los estudios histoquímicos de los animales afectados revelaron una disminución severa de acetil-colin-transferasa en las motoneuronas medulares, un aumento de la cantidad de SOD1 en el asta ventral de la médula, y neuronas motoras atroficas con abundante material neurofibrilar en el citoplasma. Estos ratones transgénicos tuvieron una actividad normal hasta los 3-4 meses, pero durante el 5º mes de vida comenzaron a deteriorarse rápidamente. En dos semanas, una o ambas patas traseras se les paralizaron de forma total **(118)**.

En este trabajo también se observa que la mutación G93A apenas tiene un pequeño efecto sobre la actividad enzimática, lo cual sugiere que el desarrollo de la patología no es debido a la pérdida de funcionalidad de la enzima si no a una ganancia de función tóxica **(118)**.

En la tabla se vuelcan los hallazgos a nivel de expresión de SOD1 en las líneas de ratones valoradas por el autor – **Tabla 2.6.**

Tabla 2.6: Expresión de SOD-1 en el ratón transgénico SOD1-G93A
Extraído de “Motor Neuron Degeneration in Mice that Express a Human Cu,Zn Superoxide Dismutase Mutation” – Gurney et al – Science (1994)

Línea	Mutación	Nº de copias	ARN SOD-1	SOD-1/Total de proteína (ng/μg)	SOD-1/Total de proteína (U/μg)
G1	Gly93Ala	18 +- 2,6	2,5 +- 0,5	4,1 +- 0,54	42,6 +- 2,1
G5		4 +- 0,6	0,8 +- 0,1	1,3 +- 0,21	27 +- 2,9
G12		2,2 +- 0,8	0,8 +- 0,1	1,1 +- 0,22	19,5 +- 0,8
G20		1,7 +- 0,6	0,8 +- 0,1	0,7 +- 0,06	16,9 +- 0,4
N1029	Salvaje	7,2 +- 2,4	1,5 +- 0,1	6,7 +- 0,76	37,3 +- 1,9
N1026		3,3 +- 1	0,4 +- 0,1	0,9 +- 0,11	18,6 +- 0,9
N1030		1,7 +- 0,7	0,3 +- 0,1	0,6 +- 0,16	11,8 +- 0,3
Normal					10,4 +- 0,5

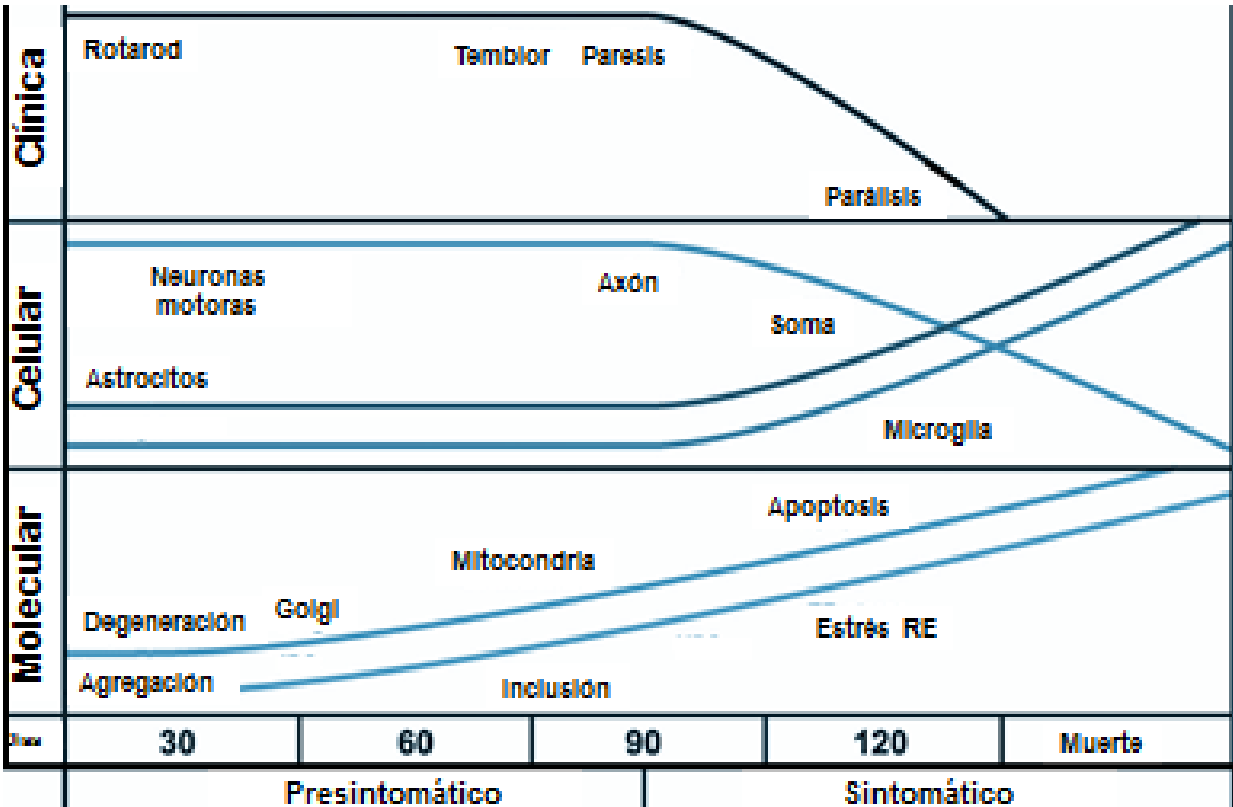


Figura 2.18: Evolución clínica y neuropatológica del ratón SOD1-G93A.
Modificado de Turner B & Talbot K: Prog Neurobiol. 2008; 85(1):94-134

A simple vista, los ratones afectados presentan parálisis de las patas posteriores (que aparecen retraídas y son incapaces de extenderlas cuando se los coge del rabo) y disminución evidente de la masa corporal a raíz de la atrofia muscular que presentan. Los primeros signos de afectación neuromuscular se delatan a través

de temblores en las patas traseras y de movimientos anormales de retraso de las mismas durante la marcha. Estas características son tenidas en cuenta en las investigaciones que se realizan con estos animales como síntomas comportamentales – **Figuras 2.18 y 2.19.**

Posteriormente otros trabajos ampliaron en profundidad las características fenotípicas y fisiopatogénicas del modelo, como así también las características de su manejo en estudios preclínicos **(120,121).**

El trabajo de Junqueira Alves et al (2011) aborda una descripción detallada de los cambios motores y electrofisiológicos del ratón G93A-SOD1 y las diferencias clínicas entre géneros. Demuestran que los machos transgénicos presentan una disminución del rendimiento en los exámenes clínicos respecto a las hembras transgénicas (especialmente en el rotarod y en el ancho de base del modelo de marcha, y menos notoria pero igualmente significativa en el test de la rejilla y en el de elevación del rabo) **(122).**

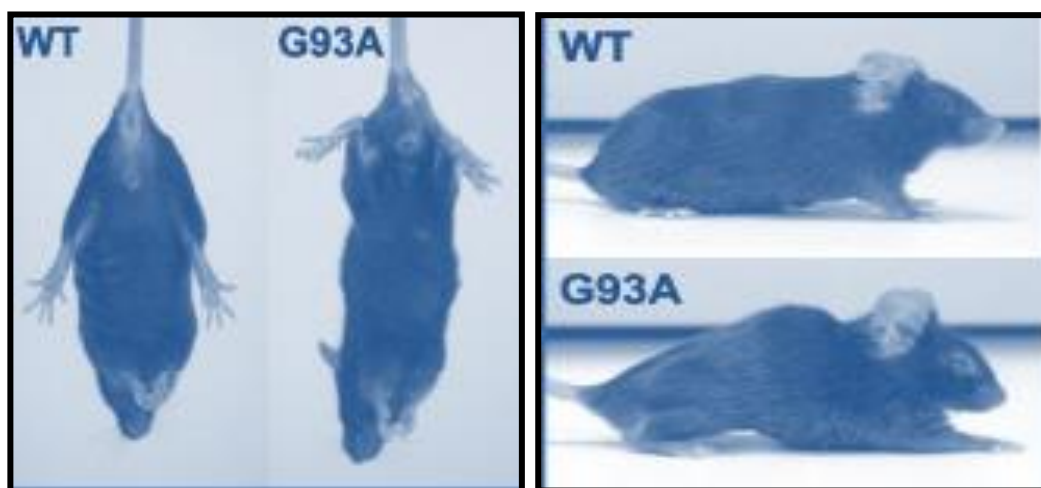


Figura 2.19: Fenotipo del ratón SOD1-G93A en comparación con el ratón normal.
Modificado de Turner B & Talbot K: *Prog Neurobiol.* 2008; 85(1):94-134

Un año antes Knippenberg S et al. realizaron también un estudio en el que evalúa la evolución de los machos y hembras SOD1-G93A comparativamente. Encontró que no hay diferencias significativas entre géneros respecto al tiempo de supervivencia ni en el momento de inicio de los síntomas, pero la dispersión de los datos en las hembras es mucho mayor que en los machos. Lo mismo se registró al analizar los cambios en la condición general de los animales **(123).**

El ejercicio físico fue relacionado con el fenotipo de machos y hembras con alta y baja dosis de la mutación G93A. Se encontró que el comienzo de la enfermedad era diferente para los dos sexos (significativamente menor en machos que en hembras) y que el ejercicio retrasa la enfermedad en las hembras pero no en los machos. Las hembras sedentarias mostraron ciclos de estro irregulares más frecuentes, sugiriéndose una mayor exposición a los estrógenos si hay ejercicio y por ende un posible efecto neuroprotector en el sexo femenino **(124).**

Puesto que este ratón transgénico es ampliamente usado en estudios preclínicos, es importante resaltar que las diferencias entre machos y hembras pueden

ser un serio obstáculo al evaluar la eficacia de un fármaco. En este sentido, en Octubre de 2012 apareció el trabajo de Bame M et al. en el que se estudiaba el efecto de la Metionina Sulfoximina sobre el sexo, la supervivencia y la progresión de la enfermedad en el modelo SOD1-G93A. Dicho estudio concluye que el sexo es un factor importante en la evolución de la enfermedad, y que la respuesta positiva de los ratones al fármaco está influida por la presencia de hormonas femeninas en detrimento de las masculinas (125).

2.11.3 - Estudios realizados con Riluzole en el modelo murino SOD1 G93A

En el LAGENBIO (Laboratorio de Genética bioquímica) dirigido por la Dra. Osta en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, se llevó a cabo un estudio con ratones SOD1-G93A para analizar la supervivencia de los mismos ante el Riluzole.

Este trabajo se realizó con 10 ratones SOD1-G93A (5 hembras y 5 machos) tratados con una dosis de 100 µg/ml de Riluzole administrada en el agua de bebida desde los 60 días de vida y 10 ratones SOD1-G93A (5 hembras y 5 machos) tratados con vehículo, y encontraron lo siguiente:

- Supervivencia del grupo control= 137 +/- 8.8 días
Supervivencia del grupo tratado con Riluzole= 139 +/- 9.7 días
p=0.73
- Inicio de los síntomas del grupo control: 105 +/- 12.2 días
Inicio de los síntomas del grupo tratado con Riluzole 102 +/- 11.1 días
p=0.56

Si bien en este estudio no se diferencian sexos y el tratamiento es anterior a la aparición de sintomatología, se reproduce lo mencionado en la literatura: el Riluzole no aumenta la supervivencia de los ratones SOD1-G93A pero ralentiza las muertes -

Figura 2.20.

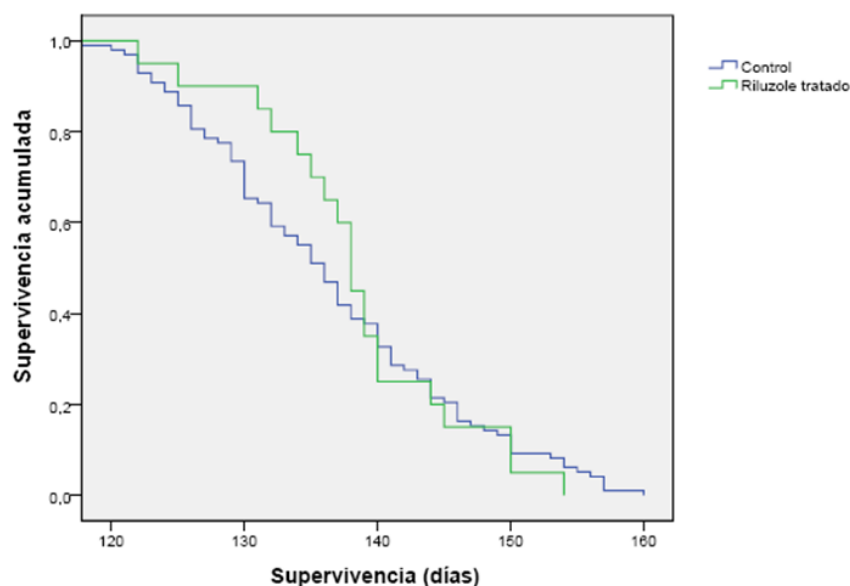


Figura 2.20: Curvas de supervivencia obtenidas para los ratones SOD1-G93A tratados con Riluzol. No aparecen diferencias significativas entre los animales tratados y no tratados con este fármaco (p=0,73). Datos cedidos por el grupo de la Dra. Rosario Osta de la Universidad de Zaragoza

BJETIVOS

El principal objetivo de este ensayo es evaluar la eficacia terapéutica de VP1.15, un inhibidor dual para GSK-3 y PDE-7, en el modelo murino más utilizado hasta el momento de Esclerosis Lateral Amiotrófica (un transgénico que sobreexpresa la enzima SOD1 humana con la mutación G93A. El análisis de los datos se realizó discriminando los resultados obtenidos en cada sexo.

El trabajo se divide en los siguientes objetivos secundarios:

- Evaluación del efecto de VP1.15 respecto a la supervivencia y a la evolución clínica de los animales estudiados
- Evaluación de la expresión de las enzimas inhibidas por VP1.15 con la consiguiente modulación de rutas de activación transcripcional y de transducción de señales
- Evaluación del efecto de VP1.15 sobre la patología celular
- Evaluación del efecto modulador del sexo en la evolución de la enfermedad

MATERIALES y **M**ÉTODOS

4.1 – Diseño del ensayo preclínico con VP1.15

- **Dosis utilizada:** 4 mg/kg
- **Frecuencia de la administración:** Inyección diaria durante 35 días
- **Vía de administración:** Intraperitoneal
- El ensayo se inicia **tras el comienzo de la sintomatología** en los animales (Con un valor de EN=1 y disminución del peso en la mitad de los animales evaluados)
- La administración del fármaco se realizó a los 87 días de edad (87,5 días \pm 2,3) de los ratones.

4.2 - Manejo de la colonia de ratones SOD1-G93A

Las consideraciones especiales sobre el manejo específico de la colonia de los ratones sometidos a estudio se extrajeron de “Working with ALS Mice. Guidelines for preclinical testing and colony Management, Leitner M., Menzies S. y Lutz C.” de The Jackson Laboratory.

Se utilizó una colonia no congénita de línea híbrida consistente en la mezcla de dos fondos genéticos distintos (SJL y C57BL/6J). Debido a esto, los machos hemicigotas transgénicos fueron cruzados con hembras normales de fondo B6SJL F1.

Se mantuvo a los animales bajo condiciones controladas de temperatura (21 \pm 1°C), luz (entre las 7:00 y las 19:00 con un ciclo de 12 hs) y humedad (50-60%). El acceso al agua y la comida (Purina Mouse Chow) fue *ad libitum* y se garantizó su acceso durante el agravamiento de la sintomatología. Además se monitorizó la presencia de patógenos comunes en el animalario para evitar posibles infecciones.

Todos los procedimientos utilizados en el ensayo siguieron las reglas internacionales para el uso de animales de laboratorio y en particular “The guidelines for the preclinical in vivo evaluation of pharmacologically active drugs for ALS/MND: report on the 142nd ENMC international workshop” (126), y fueron aprobados por el comité ético de nuestra institución.

Los ratones fueron genotipados y sexados en el momento del destete (aproximadamente entre los 21 y los 26 días de vida).

4.2.1 - Sexado

La determinación del sexo de los ratones se realiza por simple observación de la zona perianal. En los machos, la distancia entre la papila genital y el ano es mayor que en las hembras (aproximadamente el doble que en ellas) - **Figura 4.1**.

Dada la dificultad que implica el sexado visual de los animales cuando son muy pequeños, se realiza una determinación complementaria mediante la amplificación del factor determinante de testículo (SRY) a partir de los restos de tejido de las orejas marcadas.

Protocolo de PCR para sexado

- Buffer (10X): 2µl
- Mg (50 mM): 0,8 µl
- dNTPs (1 mM): 4 µl
- IL2-S (10 pM): 0,4 µl
- IL2-AS (10 pM): 0,4 µl
- SRY-S (10 pM): 0,4 µl
- SRY-AS (10 pM): 0,4 µl
- Taq pol: 0,2 µl
- H₂O: 9,8 µl
- ADN: 2µl

Programa:

98°C – 4 minutos
 98°C – 30 segundos
 60°C – 30 segundos
 72°C – 30 segundos

} x 30 ciclos

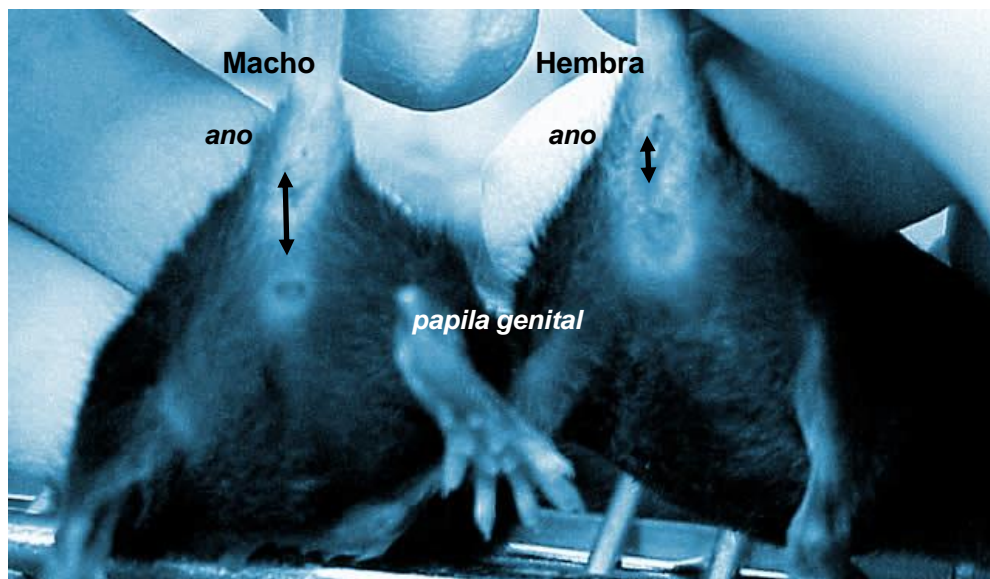


Figura 4.1: Sexado de ratones. A la izquierda un macho y a la derecha una hembra. Se observa con facilidad que la distancia entre el ano y la papila genital es mayor en los machos

Los cebadores utilizados fueron:

- SRY Sentido: 5'CTCATCGGAGGGCTAAAGTGTCAC 3'
- SRY Antisentido: 5'AGTGGGGATATCAACAGGCTGCCA 3'

identificándose un fragmento de 194 pb en los machos.

4.2.2 - Marcado auricular de los animales

Al mismo tiempo en que se separaron machos y hembras en jaulas diferentes, se realizó el marcaje auricular de los ratones según el siguiente esquema – **Figura 4.2.**

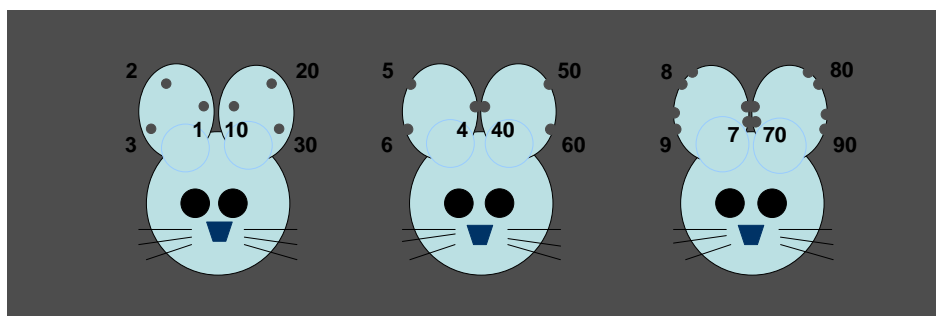


Figura 4.2: Sistema de marcaje auricular utilizado. Modificado de “Manipulating the Mouse Embryo Laboratory Manual”, 1986, Cold Spring Harbor Laboratory.

4.2.3 - Extracción de ADN y genotipado de los animales

Los restos auriculares liberados por el sacabocados utilizado durante el

marcaje de los animales, se recolectaron diferencialmente y se sumergieron en 300 µl de NaOH 50 mM.

Cada tejido se llevó a un termobloque y se calentó a 98°C durante 30 o 60 minutos (según estuviera o no suficientemente lisado). Finalmente se sometió a vórtex y se neutralizó con 30 µl de Tris 1M (pH 8). Tras una centrifugación de 6 minutos a 14.000 rpm se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo (ésta será la solución que se utilizará como fuente de ADN)

El genotipado de los ratones se realizó identificando el gen SOD1 humano con los siguientes cebadores

Protocolo de PCR para genotipado

- Buffer (10X): 2µl
- Mg (50 mM): 0,8 µl
- dNTPs (1 mM): 4 µl
- IL2-S (10 pM): 0,4 µl
- IL2-AS (10 pM): 0,4 µl
- SOD1-S (10 pM): 0,2 µl
- SOD1-AS (10 pM): 0,2 µl
- Taq pol: 0,2 µl
- H2O: 9,8 µl
- ADN: 2µl

Programa:

98°C – 4 minutos
 98°C – 30 segundos
 60°C – 30 segundos
 72°C – 30 segundos

x 30 ciclos

(<http://jaxmice.jax.org/pubcgi/protocols.sh?objtype=protocol,protocolid=523>):

- SOD1 humano sentido: 5'- CATCAGCCCTAATCCATCTGA – 3'
- SOD1 humano antisentido: 5'- CGCGACTAACAATCAAAGTGA – 3'

Los segmentos a identificar corresponden a 236 pb (en el caso de la SOD1) y de 324 pb (para IL2) – **Figura 4.3**.

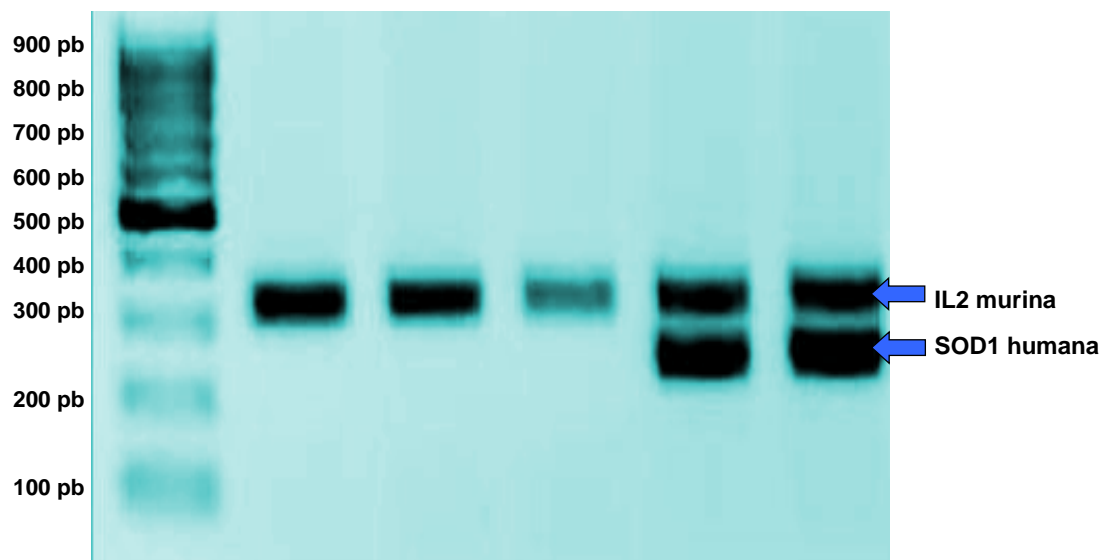


Figura 4.3: Electroforesis en gel de agarosa 1% correspondiente a la identificación del gen murino control IL2 y el transgen humano SOD1. Los fragmentos identificados tienen un tamaño respectivo igual a 324 pb y 236 pb

4.3 - Estudios comportamentales

Para evaluar la aparición de la sintomatología y la progresión de la enfermedad, los animales fueron evaluados a partir de los 60 días de edad. Se realizaron tres tipos de determinaciones:

- Disminución de la masa muscular mediante la medición del peso
- Afectación neurológica por exploración visual de signos típicos de deterioro neuromotriz
- Pérdida de coordinación y fuerza de las extremidades a través del test de la rejilla

4.3.1 - Determinación del peso

Los animales fueron pesados tres veces por semana y el dato en gramos se apuntó para considerar la evolución de cada uno de ellos. A partir del momento en que la disminución del peso de un ratón se mantuvo durante tres días correlativos, entonces se consideró que el animal era sintomático.

Se utilizó una balanza AND KE-2000i, que permite pesar hasta 2 kilogramos con una resolución de 0,1gramos.

4.3.2 - Deterioro neuromotor

Para evaluar la progresión de la enfermedad a través de los signos que manifiestan paulatinamente los animales, se empleó una escala funcional en la que se evaluó el grado de deterioro neuromuscular general y fundamentalmente en las extremidades posteriores del ratón (127).

El animal se suspendió por la cola y se observó cual era el comportamiento que desplegaban sus patas traseras bajo esa situación (Un ratón normal o que aún no experimenta sintomatología, se mueve y extiende las patas. En cambio, un afectado presenta temblores, inmovilidad más o menos parcial y retracción de las extremidades). También se registró la capacidad de andar y la posición que presentaba cada animal sobre el plano – **Figura 4.4.**

Se asignó un valor de 0 a 4 según el grado de afectación observada. Así los valores que correspondieron fueron:

- 0 = Extensión de las patas traseras con traspaso de la línea media
- 1 = Colapso total o parcial de la extensión de una pata trasera o temblor
- 2 = Inmovilidad parcial de alguna pata trasera (es arrastrada durante la marcha)
- 3 = Parálisis completa de la extremidad
- 4 = Incapacidad de incorporación tras postura en decúbito lateral

Este método también permitió determinar el momento del sacrificio del animal. Por acuerdo general entre los especialistas en el tema, el punto final de los ensayos con los modelos murinos de ELA se estableció en el momento en que no pueden reincorporarse tras ser puestos durante 30 segundos en posición decúbito lateral. Este momento coincide con el nivel 4 de la escala.

. Este test se realizó tres veces por semana, en el mismo momento en que se pesaban.

4.3.3 - Test de la rejilla

En este examen, los animales deben mantenerse cogidos a los barrotes de una rejilla (en general suele ser la tapa de una jaula) cuando ésta se voltea para dejarlos colgados. Permite registrar la fuerza de sus extremidades.

Un animal asintomático es capaz de mantenerse en esa situación durante al menos 3 minutos. Suelen deambular por toda la rejilla buscando la forma de escapar, y esto también da una idea de cuan capaces son de moverse de forma armónica. Conforme avanza la enfermedad caen antes de tiempo o directamente no son capaces de mantenerse.

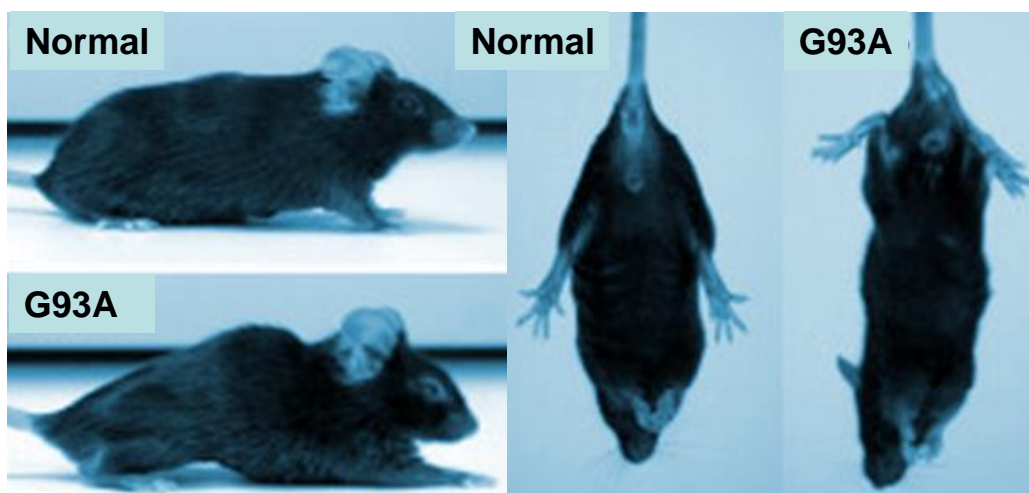


Figura 4.4: Fenotipo de los ratones SOD1-G93A. En un ratón normal se observa la total extensión de las patas traseras al ser suspendido por la cola, y no presentan cifosis al ser depositados en una superficie. En cambio en las fases terminales de la enfermedad, los ratones transgénicos SOD1-G93A presentan retracción total de las patas traseras si se encuentran suspendidos, las tienen paralizadas y presentan cifosis.

La prueba debe realizarse por duplicado y es necesario entrenar a los ratones con anterioridad a la toma de datos porque muy fácilmente eligen dejarse caer antes de cumplir con el tiempo establecido.

El examen se realizó una vez por semana.

4.4 - Preparación de VP1.15, dosificación, vía de administración y esquema de tratamiento

VP1.15 se reconstituyó con PBS1X y se llevó a una concentración de 50 mg/ml manteniéndolo a -20°C hasta su utilización.

A partir del momento en que la muestra de animales a estudiar presentó por lo menos dos parámetros anormales de los tres sistemáticamente evaluados (disminución sostenida del peso, EN=1 e incapacidad para superar el test de la rejilla), se aplicó una dosis de 4 mg/kg de forma intraperitoneal y diaria (de lunes a domingo) durante 35 días.

4.5 - Sacrificio de los animales y perfusión. Extracción de muestras

Siguiendo las recomendaciones de “The Jackson Laboratory” en “Working with ALS Mice. Guidelines for preclinical testing and colony Management”, los ratones fueron sacrificados cuando puestos en posición lateral eran incapaces de voltearse en un lapso de 30 segundos.

Se sometió a los animales a anestesia inhalatoria con Isoflurano (Forane) y al verificar ausencia total de dolor por pérdida de reflejos se perfundió con solución fisiológica a 4°C. Para ello, los pasos básicos fueron los siguientes – **Figura 4.5**:

- Incisión por debajo del esternón y las costillas
- Producción de colapso pulmonar al cortar el diafragma
- Liberación de la caja torácica
- Identificación del corazón e introducción de una aguja en el ventrículo izquierdo
- Corte de la aurícula derecha
- Perfusión con flujo constante (0,5 ml/min) hasta el lavado total de los tejidos del animal

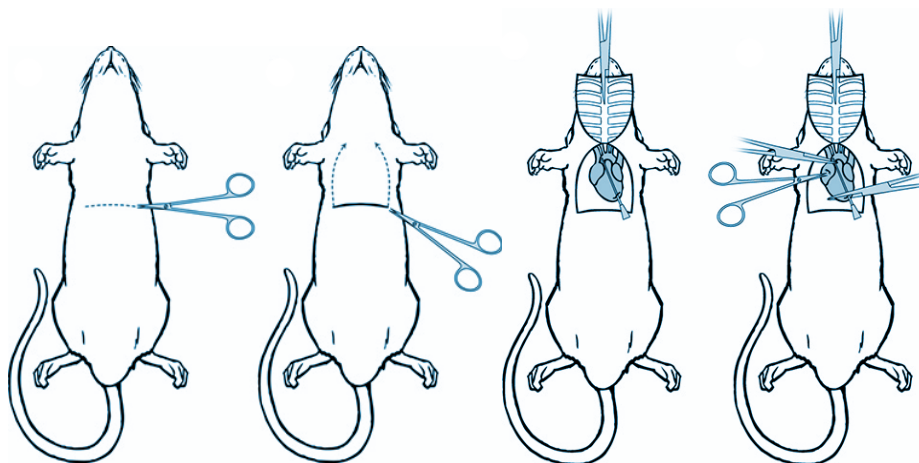


Figura 4.5: Pasos del proceso de perfusión. Incisión a nivel de las costillas y liberación de la parrilla costal. Inserción de una aguja en el ventrículo izquierdo del animal (la misma está vinculada al sistema de bombeo de solución fisiológica) y corte de la aurícula derecha. Finalmente perfusión con flujo constante hasta el lavado total de los tejidos del animal.

Mientras duró el proceso de perfusión y disección, el cuerpo del animal se mantuvo sobre una placa refrigerada para minimizar en lo posible la degradación de las proteínas. Por la misma razón se intentó realizar la extracción de tejidos de forma rápida y en el siguiente orden: encéfalo, médula, músculo e hígado.

Las muestras recogidas que iban a ser empleadas en el análisis de expresión proteica, fueron puestas inmediatamente en nieve carbónica y enviadas posteriormente a -80°C. Aquellas destinadas a histoquímica se sumergieron en una solución de paraformaldehído 4% en PBS1X durante 24 hs, y luego en una solución de PBS1X y azida sódica 0,01% hasta su procesamiento.

4.6 – Histología

4.6.1 - Corte de tejidos

Los tejidos se instalaron en pequeñas cajas de papel de aluminio que se llenaron con medio de bloqueo tisular (Tissue-Tek – OCT compound, de Sakura). Se

orientaron en la platina de un criostato previamente llevado a -20°C y se cortaron en láminas de 20 micras de grosor.

4.6.2 - Tinción de hematoxilina-eosina para visualización de fibras musculares

Esta tinción clásica permite diferenciar el citoplasma y el núcleo de las células, de acuerdo a las propiedades ácidas y básicas de sus colorantes.

Las estructuras basófilas (núcleos) se tiñen de azul a través de la hematoxilina (básica), y las acidófilas (fundamentalmente el citoplasma) de color rosa mediante la eosina (ácida).

El protocolo de tinción seguido fue el siguiente:

- Los preparados histológicos se pasaron por soluciones decrecientes de etanol 100%, 96% y 70%
- Se sumergieron durante aproximadamente 5 minutos en Hematoxilina y luego durante 30 segundos en Eosina
- Se expusieron a concentraciones crecientes de etanol 70%, 96% y 100%
- Finalmente se expusieron a fijación con Xilol durante 10 minutos y se montaron.

Hematoxilina - Eosina

- *Hematoxilina de Carazzi*
- *Eosina 1% en agua destilada*

4.6.3 - Tinción de Nissl para visualización de neuronas

Mediante esta tinción se identifican cuerpos neuronales con Violeta de cresilo (una anilina básica que se une a las regiones basófilas del tejido nervioso).

El protocolo seguido consta de los siguientes pasos:

Solución de Violeta de cresilo

- *Violeta de Cresilo 0,5% en agua destilada*

Diferenciador

- *2% Ácido acético en Etanol 96%*

- Incubación de los preparados durante 10 minutos a 45°C
- Pase por agua destilada durante unos segundos

- Exposición a concentraciones crecientes de etanol 70% y 96% durante 10 segundos en cada caso
- Pasar por una solución diferenciadora durante 10 segundos
- Pase breve por etanol 96% y luego 10 segundos por etanol 100%
- Finalmente 30 minutos en xilol y montaje con DPX.

4.6.4 - Inmunohistoquímica

Para verificar la presencia de neuroinflamación (un signo que aparece en todas las enfermedades neurodegenerativas) se realizó una tinción utilizando un anticuerpo anti GFAP (ratón anti ratón monoclonal GFAP -Sigma Aldrich-St Louis-USA).

Los cortes se permeabilizaron y bloquearon durante 1 hora con la solución de bloqueo especificada en el recuadro.

Después del lavado con PBS 1X, los cortes se incubaron con el anticuerpo anti GFAP previamente mencionado en una dilución 1:200 (en solución de bloqueo diluída 1:3) y se mantuvieron a 4°C durante toda la noche.

Después de un nuevo lavado, se agregó el anticuerpo secundario (Goat anti mouse Alexa Fluor 488-Invitrogen, Thermo Fisher-Massachusetts-USA) con una dilución 1:1000, incubándolo durante 1 hora.

Se lavó 3 veces con PBS 1X (durante aproximadamente 20 minutos) y se agregó DAPI-Sigma Aldrich-St Louis-USA, durante 30 minutos o ProLong Gold Antifade mountant with DAPI-Life Technologies-Thermo Fisher-Massachusetts-USA, según el protocolo recomendado por la casa comercial.

Finalmente se realizaron 2 últimos lavados con PBS 1X y se visualizó al microscopio de fluorescencia.

Solución de bloqueo para inmunohistoquímica

- 1% BSA
- 10% SFB
- 0,3% Tritón X-100 en PBS 1X

4.7 - Cultivo primario de astrocitos

Para realizar el cultivo de astrocitos a partir de cerebros de ratón, se sacrificó una camada de ratones neonatos de 3 o 4 días de edad.

Previo un tratamiento leve de anestesia con furano, se decapitó cada uno de los ratones, se retiró la piel, el cráneo y las meninges bajo lupa, y se depositó cada encéfalo en PBS 1X estéril a temperatura ambiente mientras se reservaba otro trozo de tejido para hacer el genotipado. Todo este proceso se realizó rápidamente ayudándose de pinzas y tijeras de disección, y manteniendo las cabezas en contacto íntimo con un desinfectante (en nuestro caso Betadine comercial).

Los cerebros se pusieron bajo flujo laminar en el cuarto de cultivos mientras se esperaba el resultado del genotipado (aproximadamente 2 horas). Allí se procedió a desmenuzarlos con bisturíes sobre placas de petri y DMEM sin Suero Fetal Bovino (SFB), y resuspendiendo los restos con pipetas de mayor a menor volumen (P1000 y P200).

El total de cada muestra se resuspendió en 10 ml de DMEM y se centrifugó durante 5 minutos a 1000 rpm y temperatura ambiente, manteniéndose el precipitado celular que debió ser resuspendido en medio fresco, repitiéndose todo el proceso de centrifugado y resuspensión 3 veces.

Una vez conseguido el resultado del genotipado, se mezclaron las muestras SOD1-G93A y SOD1-normal entre sí, en 30 ml de DMEM 10%SFB en frascos T75.

A las 24 hs se lavaron con PBS1X las células que permanecían pegadas al frasco, y se mantuvo en cultivo únicamente a los astrocitos.

4.8 - Tinción de mitocondrias en astrocitos vivos

Para realizar la tinción in vivo de las mitocondrias, 6×10^4 astrocitos se cultivaron en placas de 35 mm con 2 ml de DMEM 10% SFB.

Para comprobar si aparecen diferencias a nivel de dinámica mitocondrial en los astrocitos de los ratones SOD1-G93A y normales, se realizaron tinciones *in vivo* con Rhodamina 123 y Mitotracker 580 Red.

Se crecieron aproximadamente 200.000 células repartidas en 6 cámaras Nunc Lab-Tek II Chambered 1.5 Coverglass Sust –Thermo Scientific-Massachusetts-USA, dejándolas crecer hasta la confluencia deseada (no más del 60%).

En el momento del análisis, se retira el DMEM y se añaden 2 ml de DMEM con Mitotracker Red 580-Molecular Probes, Thermo Fisher-Massachusetts-USA a una concentración de 100 nM y 2 ml de DMEM con Rhodamina 123-Sigma Aldrich-St Louis-USA a una concentración de 30 nM.

Se incubaron las células durante 30 minutos en estufa, se retiró el medio y se enjuagaron 2 veces con 2 ml de PBS 1X a 37°C. Posteriormente se observaron en microscopio confocal.

4.9 - Determinación de la concentración tisular de AMPc mediante ELISA

Se utilizó el “DetectX – Direct Cyclic AMP enzyme immunoassay kit- Arbor Assays-Michigan-USA”, que es capaz de detectar AMPc en muestras de cultivos celulares, saliva, orina, plasma y tejidos – **Figura 4.6**.

Los tejidos utilizados en esta determinación se colocaron en un mortero con nitrógeno líquido y se trituraron hasta convertirlos en un polvo fino.

Las muestras se llevaron a una concentración de 0,1 mg/ml diluyéndolas en una solución tampón ácida provista por el kit. Dicha solución contenía aditivos y estabilizadores especiales para la medición de AMPc. Esto permitió que el AMPc fuera estable y que las fosfodiesterasas presentes en los tejidos se inactivaran durante el procesamiento.

Se incubó durante 10 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 600 g durante 15 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se guardó a -80°C hasta su procesamiento.

El kit proporcionó un estándar de AMPc con el que se realizó una curva estándar. Los valores obtenidos de las muestras se compararon con esa curva.

También proporcionó una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo para capturar IgG de oveja y una solución neutralizante que se añadió a todos los pocillos. Los estándares y las muestras diluidas, se pipetearon en esos pocillos imprimados. La reacción de unión se inició por la adición de un anticuerpo anti AMPc

Tampón de lisis desnaturalizante

Tris 10mM, pH 7,4

NaCl 150 mM

EGTA 1mM

Triton X®-100 0,5% (v/v)

Urea 6M

Leupeptina 2 µg /ml

Pepstatina 10 µg/ml

Aprotonina 3 µg/ml

Ortovanadato de Sodio (Na_3VO_4) 1mM

Pirofosfato de Sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 2mM

Fluoruro de Sodio (NaF) 5 mM

de oveja, y un anticuerpo anti AMPc conjugado con peroxidasa añadido a los estándares y muestras en cada pocillo.

Después de una incubación de 2 horas, la placa se lavó y se agregó el sustrato que reacciona con el conjugado de peroxidasa unida AMPc. Se incubó nuevamente durante media hora, se detuvo la reacción y se detectó la intensidad del color generado en un lector de placas capaz de medir a una longitud de onda de 450 nm.

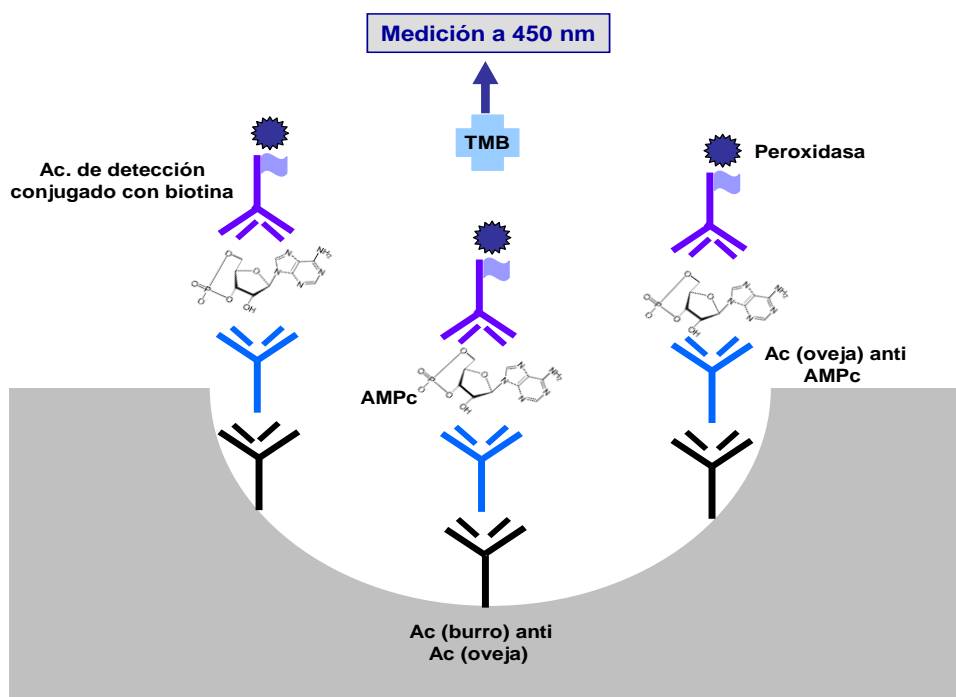


Figura 4.6: Diagrama del ELISA utilizado para medir la concentración de AMPc en los tejidos extraídos de los ratones normales y transgénicos

La concentración de AMPc en las muestras se calculó (después de hacer la corrección por dilución) usando software disponible con la mayoría de los lectores de placas. En este caso el programa Graph Prism.

4.10 - Determinación de la expresión de CREB y β -catenina mediante ELISA

Se utilizó el “Multi-kinase ELISA array Human, Rat, Mouse-Symansis-Timaru-Nueva Zelanda” – **Figura 4.7.**

Los tejidos pulverizados mantenidos a -80°C se lisaron mediante un tampón de lisis desnaturante cuya composición se ve en el recuadro.

Para optimizar el lisado se siguieron las recomendaciones de la casa comercial, utilizándose 5 mg de tejido y 300 μl de tampón de lisis.

El kit proporciona tiras de pocillos recubiertos con anticuerpos anti CREB o anti β -catenina, en los cuales se agrega e incuba la muestra durante 2 horas.

Posteriormente se agregan anticuerpos anti CREB o anti β -catenina conjugados con biotina (incubación durante 2 horas). Se agrega estreptavidina peroxidasa, y luego de una breve incubación con una sustancia que actúa como revelador (La casa comercial no proporciona información sobre ella, pero se asume que podría actuar de forma semejante a la diaminobencidina o DAB) se detiene la reacción.

La lectura se realiza en espectrofotómetro a 450 nm.

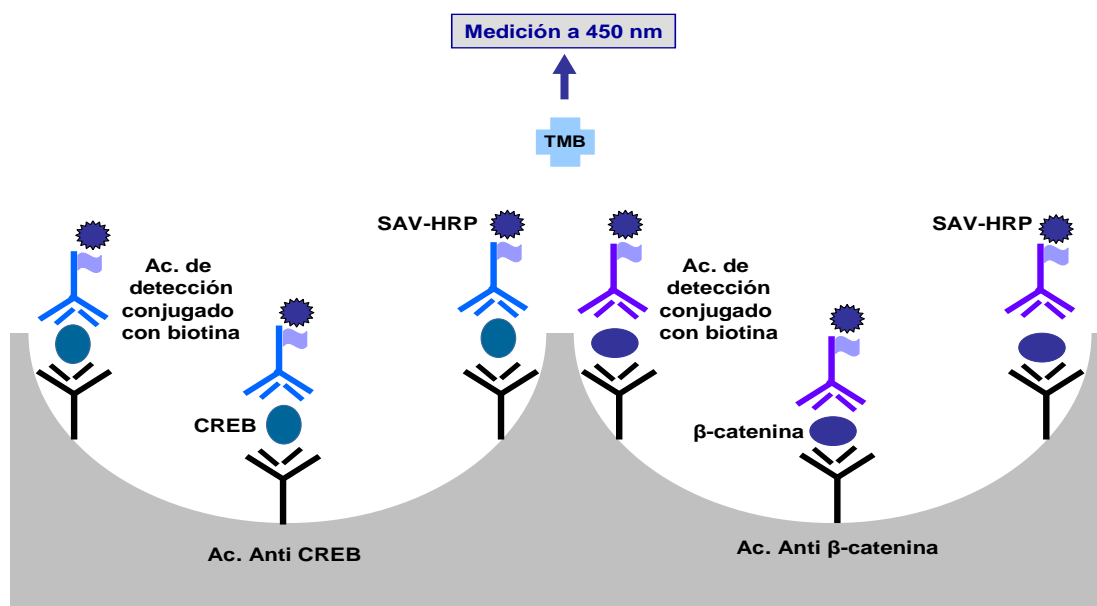


Figura 4.7: Diagrama del ELISA utilizado para analizar la expresión de CREB y β -catenina en los tejidos de los ratones normales y de los transgénicos SOD1-G93A

4.11 - Expresión proteica de GSK3, P-Ser9 GSK3, PDE7b, GFAP y OPA1 Western Blot

4.11.1 - Preparación de las muestras

Los tejidos extraídos se trituraron en un mortero mientras se agregaban cantidades paulatinas de nitrógeno líquido (en todo momento se impidió la descongelación de los tejidos manteniéndolos en nieve carbónica hasta fuesen procesados).

Una vez que las muestras estuvieron convertidas en un polvo impalpable, se agregaron 300 μ l de tampón RIPA por cada 100 μ g de muestra. La pasta formada se pasó a un tubo ependorf, se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 10.000 g y se recuperó el sobrenadante.

Tampón RIPA

- NaCl 150 mM
- Tris-HCl 50mM
- Desoxicolato 1%
- SDS 0,1%
- Tritón X-100 1%

4.11.2 - Cuantificación y preparación de proteínas

Se realizó una curva estandar de BSA utilizando el “Micro BCA Protein Assay Kit-Thermo Scientific-Massachusetts-USA”, y se cuantificaron las muestras extraídas en microplaca midiendo la absorbancia a 562 nm, para evitar la pérdida de material.

Se diluyeron las proteínas en un tampón de carga con SDS y β -mercaptoetanol como agentes desnaturalizantes, sometiéndolas a 90°C durante 5 minutos previo a cargarlas en el gel.

4.11.3 - SDS Page

Las proteínas se corrieron en geles de 1 mm de espesor que permiten cargar volúmenes de hasta 30 μ l sin problemas. En nuestro caso se resolvió utilizar 50 μ g de proteína, puesto que la curva de calibración realizada demostró que con masas de 10 μ g y 25 μ g, la baja expresión de GSK3 fosforilada no permitía la detección de bandas después del blotting. La electroforesis se realizó en sistemas “MiniProtean-BioRad-California-USA”, aplicando un voltaje constante de 70 V hasta que las muestras superaron el gel aglomerante, y de 100 V después.

La electroforesis duró aproximadamente 1:30 hs (el colorante de electroforesis debe caer del gel).

Tampón de carga

- Tris HCl 100 mM, pH6,8
- SDS 4%
- Azul bromofenol 0,2%
- Glicerol 20%
- β -mercaptoetanol 5%

Tampones utilizados en el SDS Page**Tampón cátodo:**

- Tris HCl 0,1M
- Tricina 0,1M
- SDS 0,1% pH 8,2

Tampón ánodo:

- Tris HCl 0,2M pH 8,9

Gel**Concentrador 4%:**

- 925 μ l Tampón Tris-HCl 3M, 0,3% SDS
0,3% SDS
pH 8,45

Resolutivo 10%:

- 3,325 ml Tampón Tris-HCl 3M,
pH 8,45

4.11.4 -Transferencia

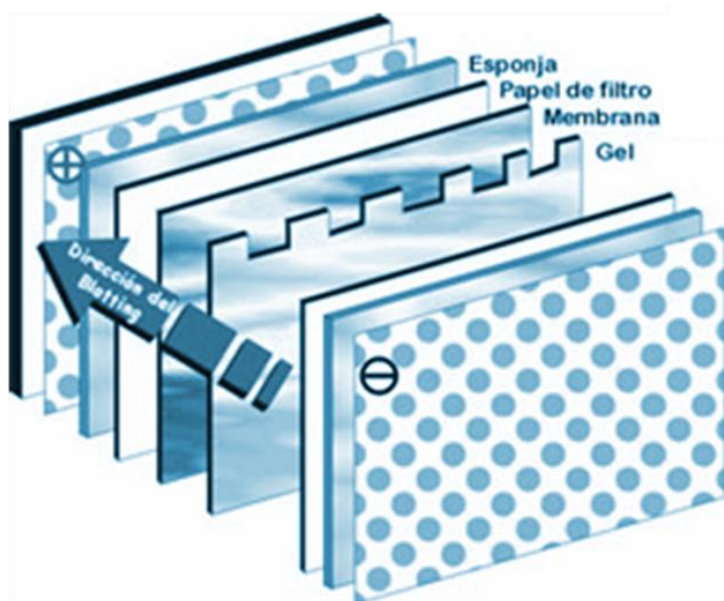
Tampón de transferencia

- Tris HCl 25 mM
- Glicina 192 mM
- Metanol 20%
- SDS 0,02%

Se realizó un sándwich en el que quedó el gel del SDS-Page y una membrana de nitrocelulosa (Whatman Protran) en íntimo contacto. El sistema de BioRad utilizado, se mantiene humedecido por la presencia de dos papeles para blotting (Whatman Gel Blot GB003) y dos esponjas previamente sumergidos en tampón de transferencia según el esquema que se adjunta.

Se transfirió a 50 mA durante 1:30 hs. A su término, la membrana se retiró cuidadosamente y se sumergió en solución de bloqueo (por lo menos 2 hs en agitación) – **Figura 4.8.**

Figura 4.8: Esquema del sistema de transferencia. Las proteínas presentes en el gel (con carga negativa debido a su interacción con el SDS) se transfieren a la membrana de nitrocelulosa cargada positivamente



4.11.5 -Inmunodetección de proteínas

La dilución del anticuerpo P-Ser9 GSK3 β se realizó en TBS1X- Tween20 0,1%-10% Albúmina, mientras que las restantes se realizaron en TBS 1X-2% leche desnatada.

En general las incubaciones con anticuerpos primarios se realizaron en 2 hs, pero especialmente con los anticuerpos anti GSK3 α/β y anti Ser9 GSK3 β , resultó aconsejable hacer incubaciones nocturnas a 4°C en agitación.

Efecto de la inhibición dual de GSK3 y PDE-7 en un modelo murino de ELA

Materiales y métodos

Las incubaciones con anticuerpos secundarios se realizaron en 2 hs a temperatura ambiente sobre un orbital. Entre unas y otras se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS1X–Tween 20 0,1%

Las siguientes son las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios empleadas

	Descripción	Reactividad	Casa comercial	Dilución empleada
Anticuerpos primarios				
GSK3-$\alpha$$\beta$	Policlonal obtenido en conejo	Ratón	SAB-Signalway Antibody-Mariland-USA	1:500
P-S9 GSK3β	Policlonal obtenido en conejo	Ratón	SAB-Signalway Antibody-Mariland-USA	1:500
PDE7-b	Policlonal obtenido en conejo	Ratón	Abcam-Cambridge-UK	1:500
GFAP	Monoclonal obtenido en ratón	Ratón	Sigma Aldrich-St Louis-USA	1:500
OPA1	Policlonal obtenido en conejo	Ratón	Abcam-Cambridge-UK	1:500
β-actina	Policlonal obtenido en ratón	Ratón	Sigma Aldrich-St Louis-USA	1:2000
Anticuerpos secundarios				
GAMPO	Obtenido en oveja, marcado con peroxidasa	IgG de ratón	Life technologies, Thermo Scientific-Massachusetts-USA	1: 2000
GARPO	Obtenido en oveja, marcado con peroxidasa	IgG de conejo	Life technologies, Thermo Scientific-Massachusetts-USA	1:2000

Cada membrana se incubó durante 4 minutos según el protocolo especificado para ECL Prime Western Blotting Detection Reagent–GE Healthcare Life Sciences-USA.

El revelado se realizó manualmente en un cuarto oscuro. Allí las membranas se expusieron a placas autoradiográficas (Hiperfilm MP– GE Healthcare-USA) empleándose Revelador-Kodak-USA y Fijador-Kodak-USA (ambos preparados según recomienda la casa comercial) hasta la aparición de las bandas y su fijación.

4.12 - Estudios estadísticos

Como los datos no siguen una distribución conocida, se emplearon test no paramétricos (Mann Whithney y Kruskal Wallis) para analizar los eventos (tiempo de sacrificio, aparición de cifosis, disminución al 90% del peso inicial y 90 segundos de resistencia en el test de la rejilla) que debíamos considerar.

Tanto el estudio estadístico como los gráficos obtenidos (Kaplan Meier, de barras y cajas) se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism5.

El nivel de significación se definió como $p < 0,05$.

RESULTADOS

5.1 - Ensayos de toxicidad

En un ensayo preclínico realizado con anterioridad en nuestro laboratorio, con un esquema semejante al que aquí se presenta, pero en el que se trabajó con una dosis de VP1.15 de 7,5 mg/kg, se demostró que el fármaco resultaba tóxico y provocaba muerte precoz asociada al tratamiento. La dosis evaluada fue elegida a raíz de estudios, que en ese momento estaban en curso, en los que se utilizaba esa dosis en un modelo murino de esquizofrenia **(114)**.

En esa oportunidad se trabajó con 9 hembras y 11 machos normales, y 9 hembras y 11 machos SOD1-G93A a los que se les administró intraperitonealmente VP1.15. Como controles se utilizaron 7 hembras SOD1-G93A y 7 machos SOD1-G93A a los que se les administró vehículo.

A los 15 días de iniciado el procedimiento, éste tuvo que suspenderse porque para entonces había muerto el 22,7% de los machos (2 transgénicos SOD1-G93A y 3 normales) y el 5,5% de las hembras (1 transgénica SOD1-G93A). Además, 6 de los supervivientes presentaban un bulto en su lateral derecho que sugería la presencia de hepatomegalia, y aunque las necropsias posteriores no confirmaron esta sospecha inicial (para el momento del sacrificio tales bultos ya no se visualizaban), inferimos que el proceso hepatotóxico fue reversible. En cambio, en el análisis de los restos de los animales muertos durante el tratamiento aparecieron evidencias de afectación del páncreas, el hígado y el riñón (por hemorragias), y dilatación del intestino delgado.

A raíz de los resultados del primer estudio, para evaluar la toxicidad y aplicar la dosis más adecuada para este ensayo, se sometió a un grupo de 30 ratones normales a distintas dosis del fármaco (4 mg/kg, 2 mg/kg y 1 mg/kg) y se inyectó de forma intraperitoneal con vehículo ($8,25 \cdot 10^{-5}$ V/V DMSO/tampón PBS 1X) a un grupo de 10 ratones normales para verificar que la solución de DMSO no producía reacciones colaterales. Dichos grupos se subdividieron a su vez en machos y hembras, y quedaron conformados de la siguiente manera:

- 5 hembras y 5 machos con VP1.15 – 4 mg/kg
- 5 hembras y 5 machos con VP1.15 – 2 mg/kg
- 5 hembras y 5 machos VP1.15 – 1 mg/kg
- 5 hembras y 5 machos con vehículo

Las dosis fueron elegidas en base a un estudio realizado por el grupo de Seung H. Kim con un fármaco similar **(128)**.

No se encontraron efectos adversos en ninguno de los grupos evaluados (machos y hembras inyectados con 4 mg/kg, 2 mg/kg, 1 mg/kg y vehículo). Finalmente se eligió la dosis superior empleada (4 mg/kg) para realizar el estudio sobre los ratones SOD1-G93A.

5.2 - Análisis de supervivencia

El estudio se realizó sobre un total de 30 ratones SOD1-G93A hembras y 22 ratones SOD1-G93A machos. Un grupo de 15 hembras fue inoculado con VP1.15, y las otras 15 solo con vehículo. De los machos, 11 fueron tratados con el fármaco, mientras otros 11 fueron asignados como controles e inyectados sin él.

Al analizar el total de la muestra de hembras se obtiene que - **Figura 5.2;**

Tabla 5.2:

- La mediana de supervivencia de los ratones SOD1-G93A hembras no tratadas con VP1.15 es igual a 144 días.
- La mediana de supervivencia de los ratones SOD1-G93A hembras tratadas con VP1.15 es igual a 142 días
- No aparecen diferencias significativas entre las hembras tratadas y no tratadas con el fármaco ($p=0,7021$)
- Tasa de riesgo relativo (entre hembras)= 0,8646

Al analizar el total de machos tratados y no tratados con el fármaco se obtuvo -

Figura 5.1; Tabla 5.1 (anexo):

- La mediana de supervivencia de los ratones SOD1-G93A machos no tratados fue igual a 132 días
- La mediana de supervivencia de los ratones SOD1-G93A machos tratados fue igual a 138 días
- No aparecen diferencias significativas entre los machos tratados y no tratados con el fármaco ($p=0,0560$)
- Tasa de riesgo relativo (entre machos)= 2,753

Puesto que los ratones transgénicos utilizados pertenecen a una cepa no congénica, resulta importante evaluar la supervivencia entre hermanos de camada para considerar un fondo genético lo más homogéneo posible. Se estudiaron 12 hembras y 12 machos, la mitad de los cuales en ambos casos fueron tratados con VP1.15, y el resto sometidos a placebo. De esta forma, los resultados hallados son los siguientes – **Figuras 5.1 y 5.2; Tablas 5.1 y 5.2 (anexo).**

En ratones SOD1-G93A hembras hermanas de camada:

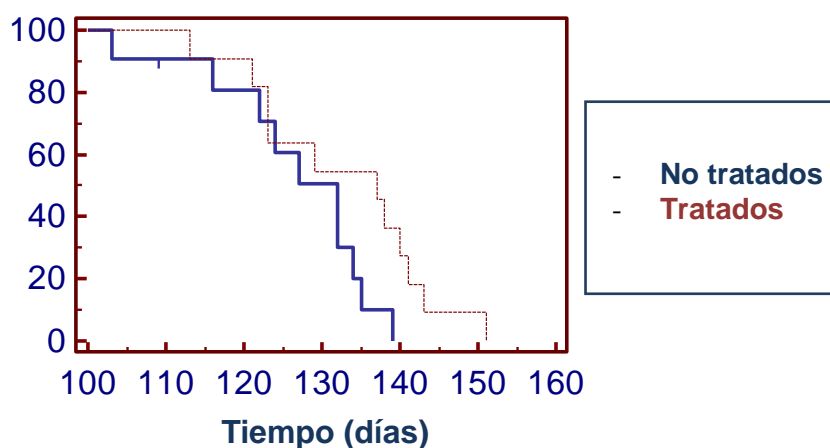
- La mediana de supervivencia de las hembras no tratadas fue igual a 146,5 días
- La mediana de supervivencia de las hembras tratadas fue igual a 140,5 días
- No aparecen diferencias significativas entre las hembras tratadas y no tratadas ($p=0,4132$)
- Tasa de riesgo relativo (entre hembras hermanas de camada)= 0,5890

En ratones SOD1-G93A machos hermanos de camada:

- La mediana de supervivencia de los machos no tratados fue igual a 127 días
- La mediana de supervivencia de los machos tratados fue igual a 140 días
- No aparecen diferencias significativas entre los machos tratados y no tratados ($p=0,0667$)
- Tasa de riesgo relativo (entre machos hermanos de camada)= 4,266

Los estudios previos realizados utilizando este modelo animal, registran diferencias entre los géneros. Haciendo foco en lo que a supervivencia se refiere, se observa que las hembras viven más que los machos. En este estudio se reproduce lo observado en la literatura. Tanto en la muestra total de hembras y machos tratados como entre hembras y machos no tratados, los valores de supervivencia resultan significativos y con diferencias aún más amplias en el segundo caso ($p=0,0459$ y $p=0,0016$ respectivamente) – **Tabla 5.1 (anexo)**. Entre hermanos de camada, solo se observan diferencias significativas entre aquellos animales que no fueron inyectados con VP1.15 ($p=0,0294$) – **Tabla 5.2 (anexo)**.

Machos totales (N=22)



Machos hermanos de camada (N=12)

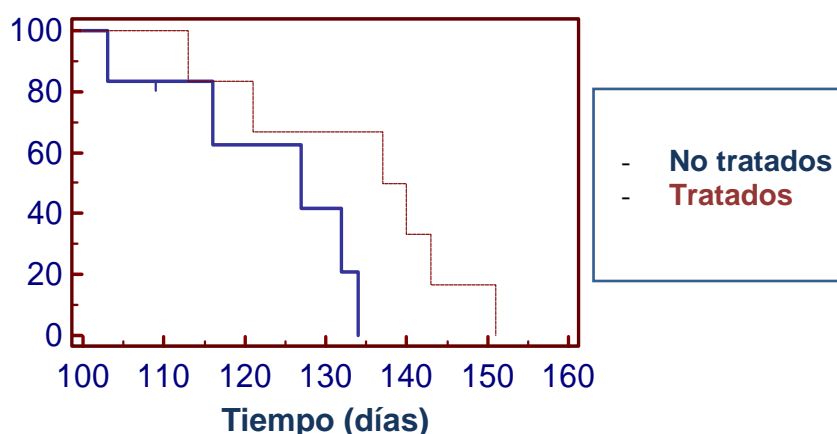
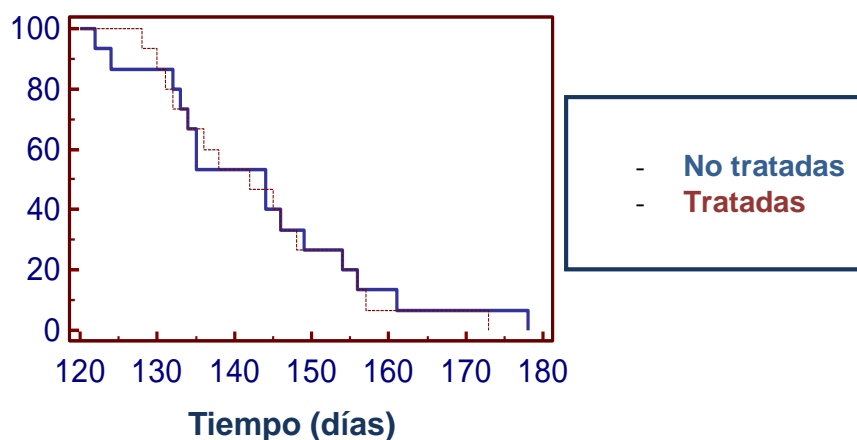


Figura 5.1: Curvas de supervivencia del total de ratones macho SOD1-G93A (arriba), y de los ratones macho SOD1-G93A hermanos de camada (debajo). Total de machos: La mediana de supervivencia de los machos no tratados fue igual a 132 días. La mediana de supervivencia de los machos tratados fue igual a 138 días. $p=0,0560$ y Tasa de riesgo relativo=2,753. Machos hermanos de camada: La mediana de supervivencia de los machos no tratados fue igual a 127 días. La mediana de supervivencia de los machos tratados fue igual a 140 días. $p=0,0667$. Tasa de riesgo relativo=4,266

Hembras totales (N=30)



Hembras hermanas de camada (N=12)

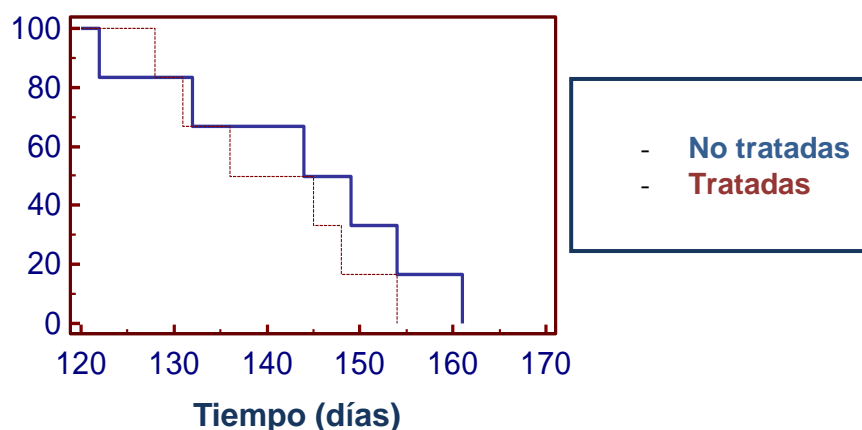


Tabla 5.2: Curvas de supervivencia del total de ratones hembras SOD1-G93A (arriba) y de los ratones hembra SOD1-G93A hermanas de camada (debajo). Total de hembras: La mediana de supervivencia de las hembras no tratadas fue igual a 144 días. La mediana de supervivencia de las hembras tratadas fue igual a 142 días. $p=0,7021$ y Tasa de riesgo relativo=1,1324. Hembras de camada: La mediana de supervivencia de las hembras no tratadas fue igual a 146,5. La mediana de supervivencia de las hembras tratadas fue igual a 140,5 días. $p=0,4132$. Tasa de riesgo relativo=1,5342

El intervalo de supervivencia es el lapso entre la administración del fármaco y la supervivencia posterior. Está determinado por la respuesta media al tratamiento y la respuesta media del control, de tal forma que sigue la fórmula: $IT = mT - mC$, con mT (respuesta media al tratamiento) y mC (respuesta media del control). Se trata de un

parámetro importante a la hora de comparar la eficacia de un tratamiento frente a otro (129).

En nuestro estudio se observa que los valores de supervivencia, el intervalo de supervivencia individual y la edad de inicio de la sintomatología para los machos SOD1-G93A tratados y no tratados con VP1.15, están reflejados en la **Tabla 5.3 (anexo)**.

Por lo tanto el Intervalo de supervivencia de los ratones SOD1-G93A machos de nuestro estudio es igual a 7,64 días (IT= 47,09 días – 39,45 días), que correspondería a una prolongación de 19,37% de la supervivencia.

Si los mismos cálculos se realizan con los datos de los machos SOD1-G93A hermanos de camada se obtiene que el intervalo de supervivencia es igual a 13,84 días, y llevaría a considerar una prolongación de la supervivencia del 39,17% - **Figura 5.3**.

No tiene objeto profundizar en este análisis en el caso de las hembras SOD1-G93A pues las curvas de supervivencia muestran que no se ven beneficiadas por la administración de VP1.15, incluido el análisis realizado en las hermanas de camada.

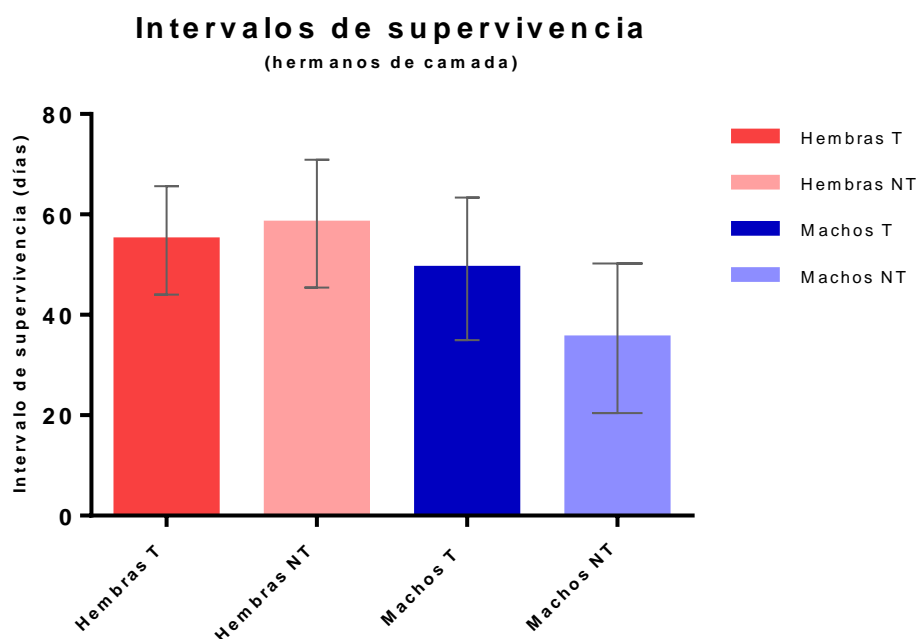


Figura 5.3: Intervalos de supervivencia de los ratones SOD1-G93A hermanos de camada, según sexo y condición de tratamiento.

Hembras tratadas: IT=54,8 días +/- 11,74 - Hembras no tratadas: IT=55,33 días +/- 14,62

Machos tratados: IT=49,17 días +/- 14,22 – Machos no tratados: IT=35,33 +/- 14,92

Más interesante aún es intentar comparar la efectividad de VP1.15 frente al Riluzol (único fármaco aceptado en el tratamiento de la enfermedad).

Utilizando como dato las medias de supervivencia obtenidas en un estudio donde se aplicó Riluzol al modelo SOD1-G93A (datos generosamente cedidos por el grupo de la Dra. Osta del LAGENBIO – Universidad de Zaragoza), se obtuvieron los siguientes resultados:

- La media de supervivencia de los machos no tratados (Media = 126,4, DS = 10,72) es significativamente diferente ($p = 0,0048$) a la media de supervivencia de los ratones SOD1-G93A tratados con Riluzole (Media = 139, DS = 9,7). Por el contrario los valores para las hembras tratadas y no tratadas (Media = 143,3 y Media = 143,8; DS = 12,64 y DS = 15,74; $p = 0,2056$ y $p = 0,2572$ respectivamente) no son significativamente diferentes. Lo mismo sucede con la media de supervivencia de los machos tratados (Media = 132,9; DS = 11,71 y $p = 0,1152$). Pero, la media de supervivencia de los machos no tratados también resulta significativamente diferente a la de los ratones SOD1-G93A usados como control (Media = 137, DS = 8,8) – **Figura 5.4 (anexo)**.
- Respecto a los hallazgos entre hermanos de camada, se observa aproximadamente lo mismo. El grupo de machos no tratados tiene una media de supervivencia que difiere significativamente (Media = 122,4; DS 12,9; $p = 0,0122$) de la encontrada en el laboratorio de Zaragoza para el

Media de supervivencia en el ensayo preclínico con VP15.1 respecto a lo obtenido en un ensayo con Riluzol (total de la muestra)

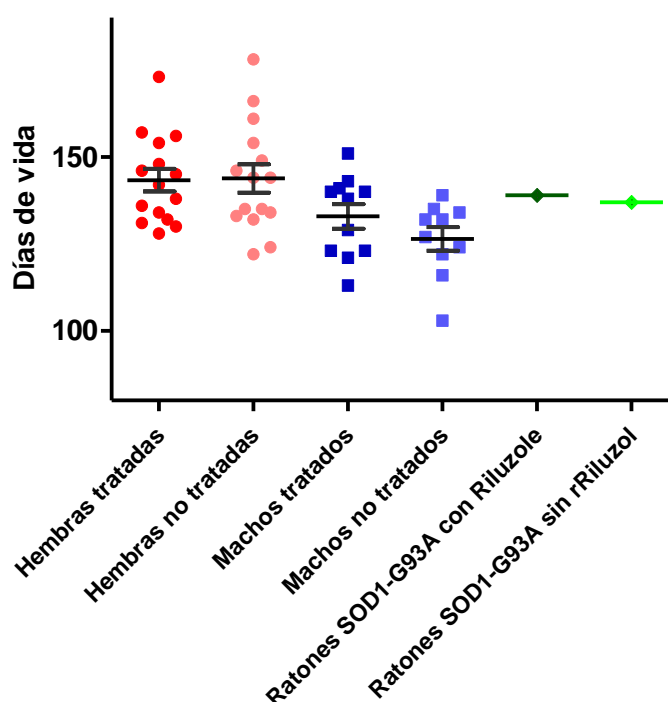


Figura 5.4: Comparación del efecto del VP1.15 y el Riluzol sobre los ratones SOD1-G93A, a través de los valores de media de supervivencia obtenidos en ambos casos. En este caso se analizan las medias de supervivencia de la muestra total de ratones SOD1-G93A expuestos al VP1.15 y los valores obtenidos (tratados y controles) en un ensayo con Riluzol.

grupo de sus ratones SOD1-G93A tratados con Riluzol. El resto de los animales, independientemente de su sexo y tratamiento, no presentaron diferencias significativas. Por el contrario, la comparación con la media de

supervivencia de los ratones control, arroja que no se encuentran diferencias significativas ($p = 0,0646$) – **Figura 5.5 (anexo)**.

La muestra de ratones SOD1-G93A objeto del estudio con VP1.15 derivaba de aquella con que se realizó la experiencia con el Riluzol, por eso fue sorprendente encontrar que los valores de supervivencia entre ellos fueran tan disímiles.

Los machos no tratados con VP1.15 parecen comportarse como un grupo sesgado a pesar de haber sido elegidos mediante aleatorización. Aun así al analizar a los hermanos de camada, nos encontramos con que ambos grupos de ratones (los utilizados como controles para el ensayo con Riluzole y los utilizados para VP1.15) no presentan diferencias significativas.

Media de supervivencia en el ensayo preclínico con VP15.1 respecto a lo obtenido en un ensayo con Riluzol (hermanos de camada)

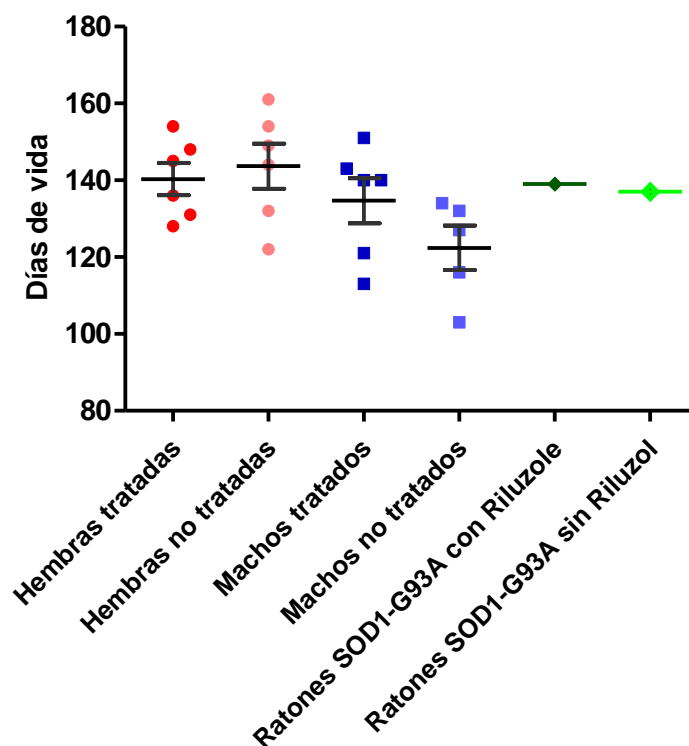


Figura 5.5: Comparación del efecto del VP1.15 y el Riluzol sobre los ratones SOD1-G93A, a través de los valores de media de supervivencia obtenidos en ambos casos. En este caso se analizan las medias de supervivencia de la muestra de hermanos de camada SOD1-G93A expuestos al VP1.15 y los valores obtenidos (tratados y controles) en un ensayo con Riluzol.

Es importante señalar que en esta aproximación se está menospreciando el hecho de que los valores a comparar se obtienen a partir de diseños de ensayos distintos. En el caso del estudio con Riluzol se utilizan ratones machos y hembras indistintamente. Sus resultados no contemplan las variaciones de género que el ensayo con VP1.15 tiene en cuenta, y que podrían estar afectando este análisis

comparativo (es razonable contar con medias de supervivencia mayores a las obtenidas en nuestro ensayo puesto que las hembras del modelo SOD1 G93A viven más tiempo que los machos).

Aun así, si nos basamos en que estos animales son razonablemente semejantes, los resultados obtenidos podrían estar indicando que VP1.15 es tan eficiente como el Riluzol,

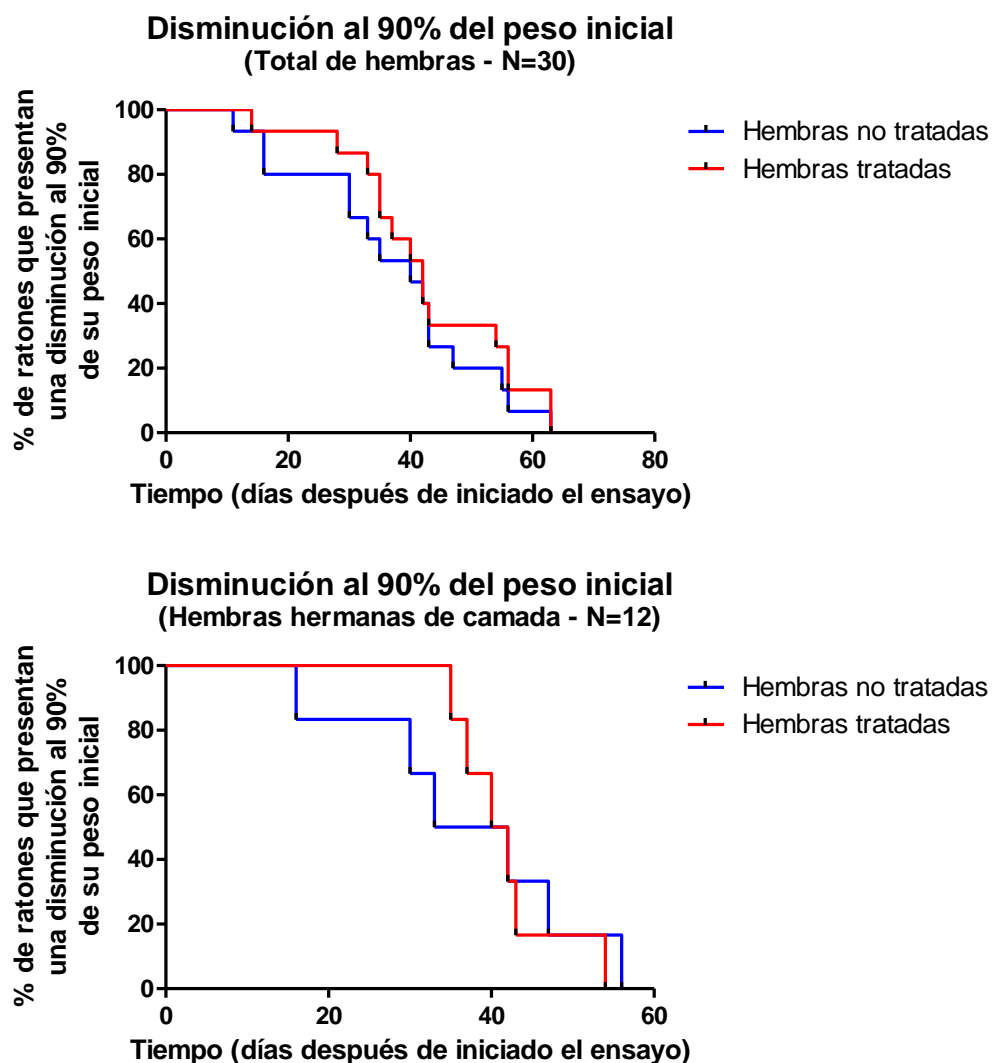


Figura 5.6: Curvas de Kaplan Meier (evento: disminución del 10% de la masa corporal) del total de ratones hembras SOS1-G93A (arriba), y de los ratones hembra SOD1-G93A hermanas de camada (abajo). Total de hembras (n=30): $p=0,4337$ y Tasa de riesgo relativo=1,379. Hermanas de camada (n=22): $p=0,9213$ y Tasa de riesgo relativo=0,9401

5.3 - Análisis de la evolución de la enfermedad

(parámetros: peso, debilidad muscular y escala neurológica)

5.3.1 - Peso:

Todos los ratones SOD1-G93A, independientemente de su sexo y situación frente al tratamiento, experimentan una pérdida paulatina del peso a lo largo de su enfermedad. Esto es consecuencia fundamental de la atrofia muscular que experimentan.

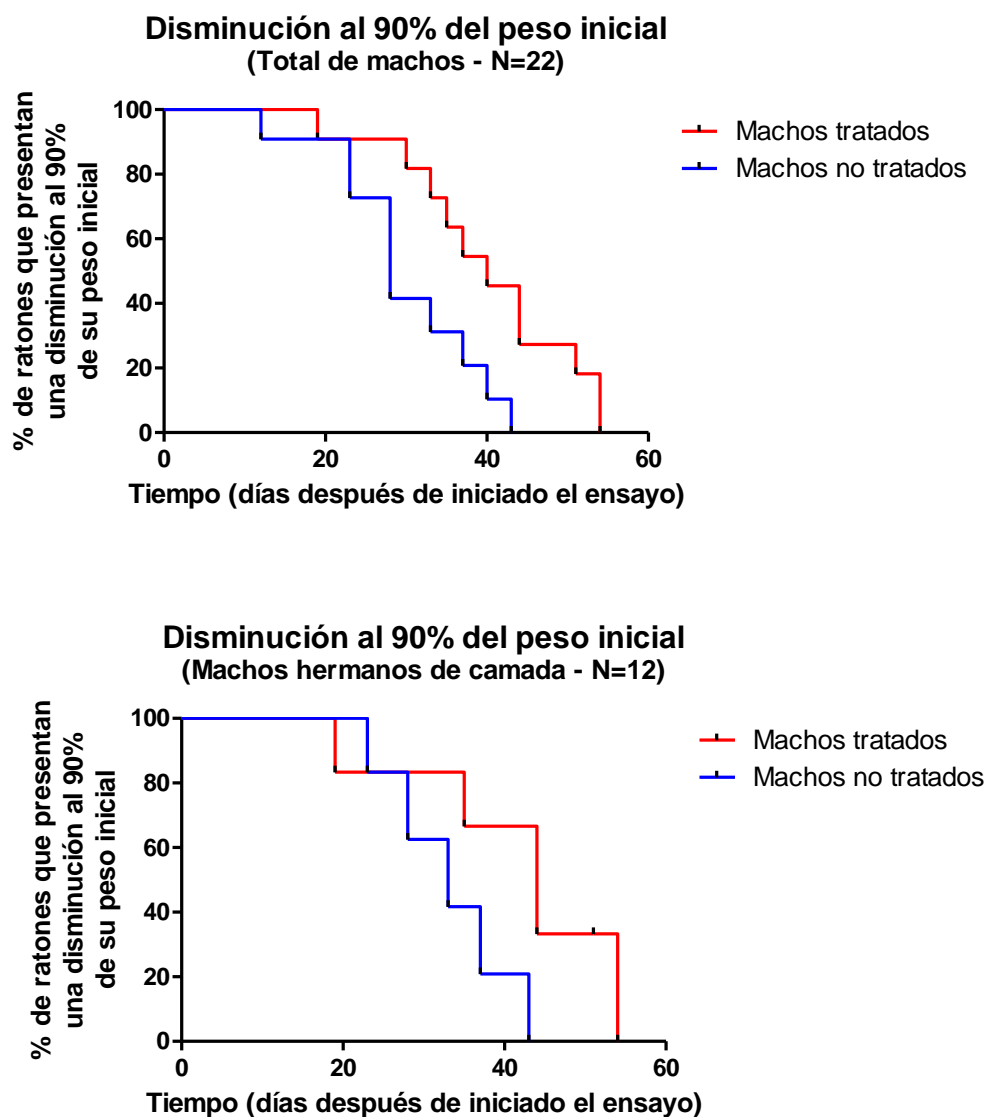


Figura 5.7: Curvas de Kaplan Meier (evento: disminución del 10% de la masa corporal) del total de ratones machos SOD1-G93A (arriba), y de los ratones machos SOD1-G93A hermanos de camada (abajo). Total de machos (n=22): $p=0,0156$ y Tasa de riesgo relativo=3,834. Hermanos de camada (n=12): $p=0,0642$ y Tasa de riesgo relativo=4,390

No parecen registrarse variaciones importantes entre machos SOD1-G93A tratados y no tratados (sobre el total de la población estudiada o solo entre hermanos de camada), y tampoco se registran entre las hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas (aunque pareciera evidenciarse una pérdida de peso más acusada en la población general) – **Figuras 5.6 y 5.7.**

Como la disminución del peso corporal es un parámetro fácilmente determinable, y como está claramente relacionado con el deterioro de un animal, su medición en animales de laboratorio es una práctica habitual para evaluar el punto final o momento de sacrificio (<http://www.lal.org.uk/publications/this-is-a-test-subject/humaneendpoints/>; http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf)

En general se aplica el siguiente criterio:

- una disminución del 5-10% se considera aceptable
- moderada, si se encuentra entre el 10-20%
- sustancial > al 20%, y motivo de certificación de punto final

Por lo tanto hemos considerado que una disminución del 10% en el peso puede ser usada para verificar si existen diferencias significativas en cuanto a la velocidad de progresión de la atrofia muscular entre los grupos estudiados (hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas, y machos SOD1-G93A tratados y no tratados).

Los resultados fueron los siguientes - **Figuras 5.6 y 5.7; Tablas 5.4 y 5.5:**

- Aparecen diferencias significativas ($p=0,0156$) en el total de machos SOD1-G93A según estén sometidos o no a tratamiento. La razón de riesgo en este caso es igual a 3,834. Si se comparan las curvas entre los hermanos de camada, se registra que no hay diferencias significativas entre los grupos de ratones SOD1-G93A tratados y no tratados, con un $p=0,0642$ y una Razón de riesgo de 4,390.
- En la muestra total de hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas, no aparecen diferencias significativas ($p=0,4337$) y la Razón de riesgo resulta igual a 1,379. En las hembras hermanas de camada, tampoco aparecen diferencias significativas ($p=0,9213$) y la Razón de riesgo es igual a 0,9401.

En base a ellos, se observa que el efecto de VP1.15 es positivo respecto a ralentizar el deterioro muscular y la consiguiente pérdida del peso de los machos. Contrariamente, no parece ejercer el mismo efecto en las hembras. El peso de las hembras tratadas disminuye con la misma velocidad aproximada que el peso de las no tratadas.

5.3.2 - Escala neurológica:

La evolución neurológica de todos los ratones SOD1-G93A se explica mediante una curva de tipo sigmoideo donde se observa que, tras la primera aplicación del fármaco, estos animales empeoran paulatinamente su sintomatología – **Figura 5.8.**

Los machos SOD1-G93A no tratados manifiestan un desarrollo más rápido de los indicadores de progresión neurológica evaluados según la escala utilizada. La curva de estos animales se aleja perceptiblemente de la manifestada por los machos tratados, en especial a medida que los animales empeoran y son clasificados en el

nivel 3 (aproximadamente a los 40 días de iniciada la administración de VP1.15 respecto al retraso observado de 50 días en el resto de animales) – **Figura 5.9.**

Es al final de esta fase cuando los animales presentan cifosis producida por el agravamiento de la atrofia muscular. Resulta el primer signo que aparece justo antes de ser clasificados en fase 4 y presentar parálisis total.

Las hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas siguen una evolución neurológica similar, más lenta que en los machos y no aparecen mayores diferencias entre ellas. Es notable, que tanto en los machos SOD1-G93A tratados de la población total y fundamentalmente entre los hermanos de camada, sus curvas evolutivas se acerquen a las de las hembras. Pareciera por lo tanto, que existe una diferencia clara de respuesta al fármaco dependiendo del sexo, puesto que los machos SOD1-G93A no tratados presentan sintomatología terminal mucho antes (aproximadamente 7 días) - **Figura 5.10.**

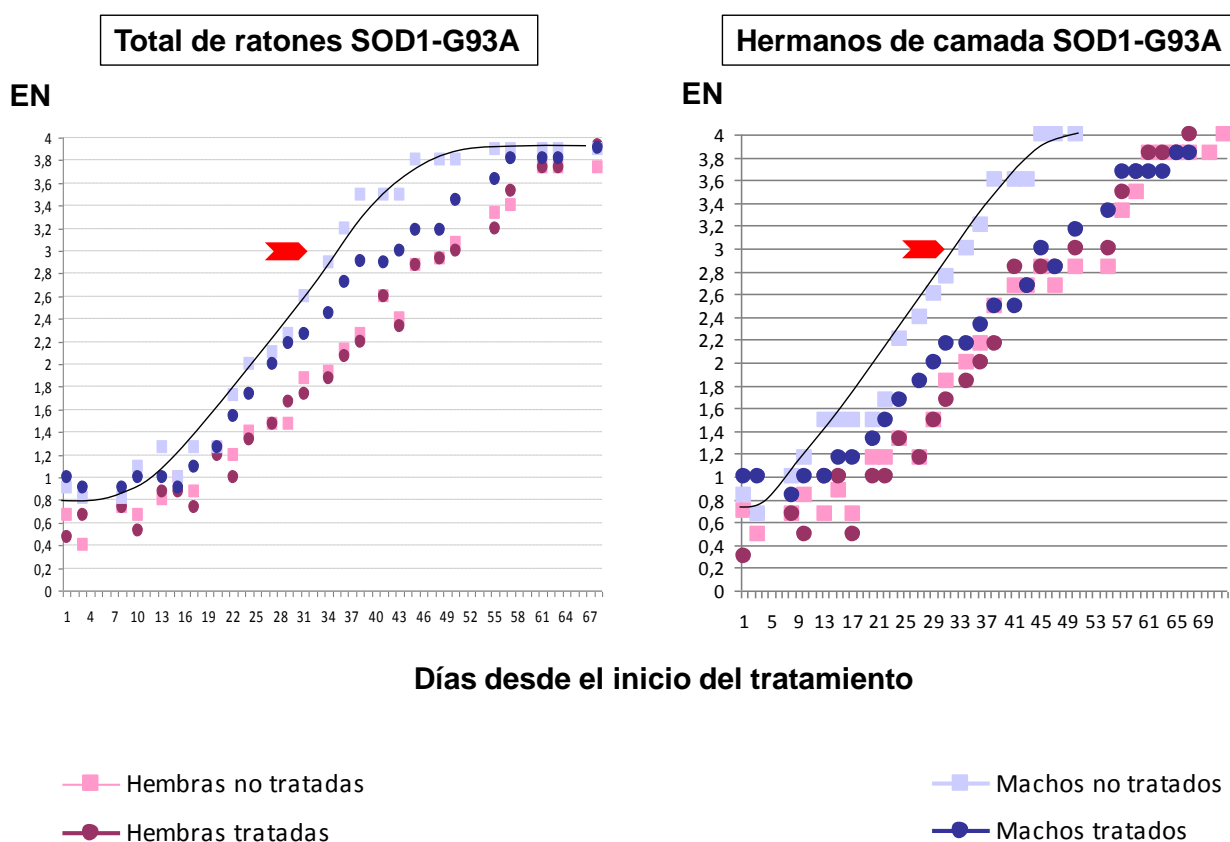


Figura 5.8: Representación de la evolución neurológica (EN) en los ratones SOD1-G93A desde el inicio de su tratamiento con VP1.15 hasta su muerte.

Se observa como la curva que representa a los machos no tratados se aparta rápidamente de las demás, tanto cuando se analiza el comportamiento del total de la muestra, como si se hace solo entre hermanos de camada

La flecha roja indica cuando los animales son clasificados con EN=3, momento en el que coincide la aparición de cifosis.

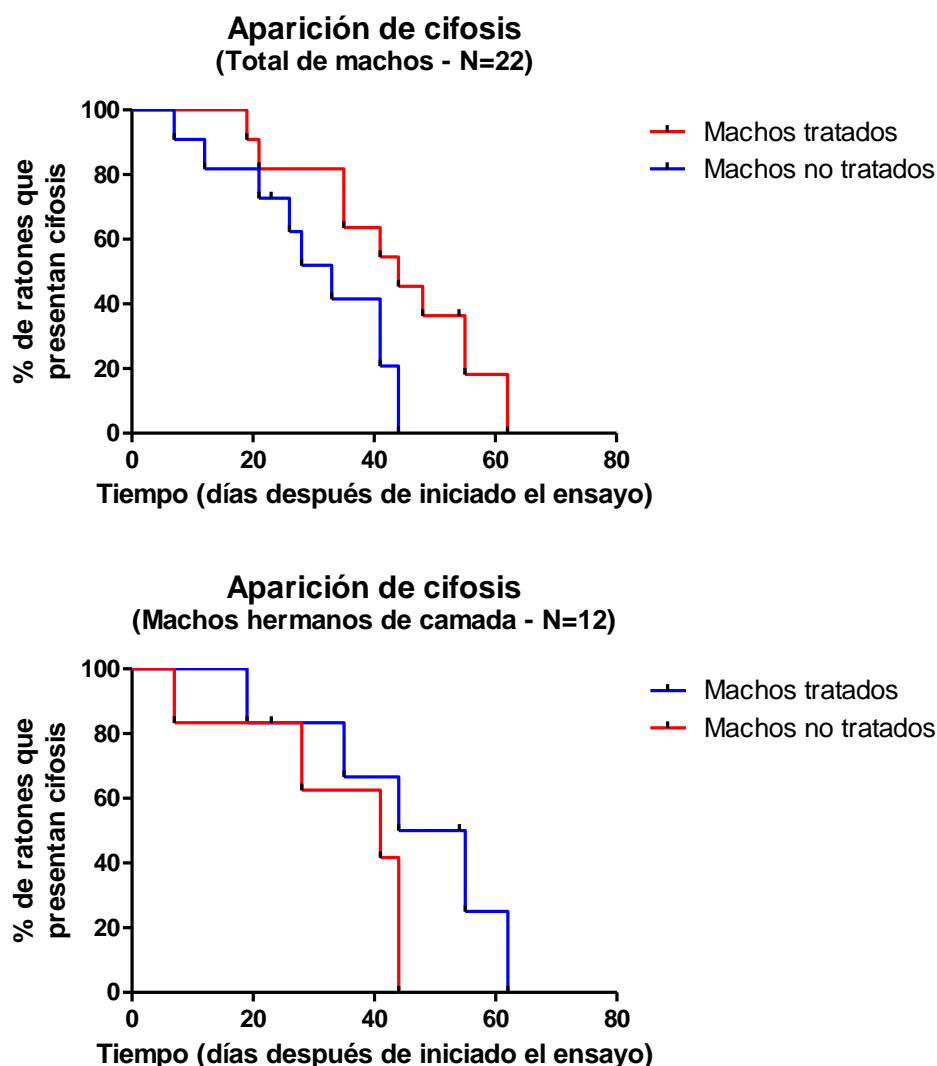


Figura 5.9: Curvas de Kaplan Meier – Evento evaluado: aparición de cifosis en ratones macho SOD1-G93A en el total de la muestra estudiada (gráfico superior) y entre los hermanos de camada (gráfico inferior). Muestra total de machos ($n=22$), aparecen diferencias significativas entre los machos tratados y los no tratados ($p=0,0282$) y Tasa de riesgo relativo=0,2977. Machos hermanos de camada ($n=12$), no hay diferencias significativas entre los machos tratados y los no tratados ($p=0,1584$ y Tasa de riesgo relativo=0,4711)

Para determinar estadísticamente como varían los diferentes grupos de ratones SOD1-G93A entre sí (según sexo y condición frente al tratamiento con VP1.15.), hemos elegido el momento de aparición de cifosis en los animales para evaluarlos comparando curvas de supervivencia.

Se ha encontrado lo siguiente - **Figuras 5.9 y 5.10; Tabla 5.6 (anexo):**

- Aparecen diferencias significativas en el total de machos SOD1-G93A tratados y no tratados ($p=0,0282$), no así entre hermanos de camada donde el Valor p aumenta a 0,1584. Las Tasas de riesgo son respectivamente, iguales a 3,359 y a 3,024.

- En la muestra de hembras SOD1-G93A total, no aparecen diferencias significativas entre tratadas y no tratadas ($p=0,54$). Lo mismo se repite entre las hermanas de camada

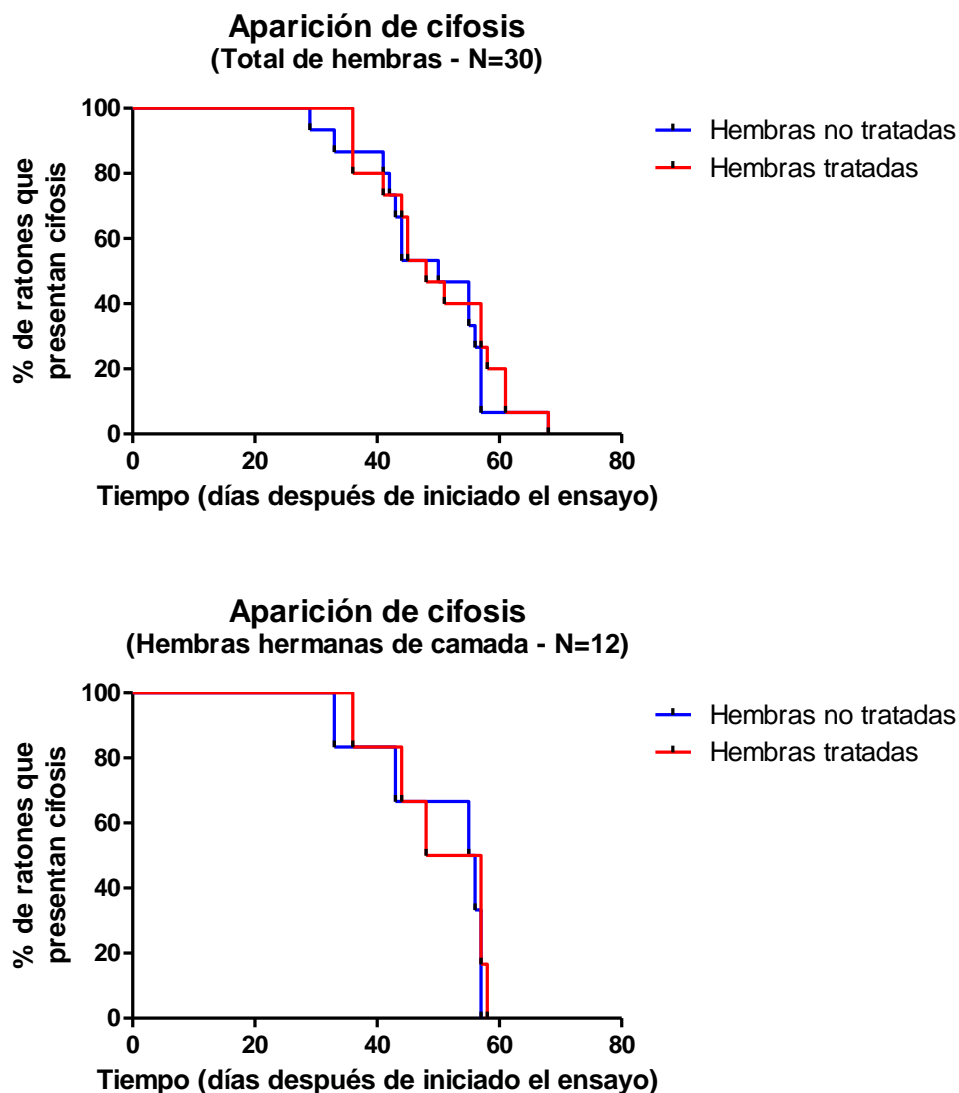


Figura 5.10: Curvas de Kaplan Meier – Evento evaluado: aparición de cifosis en ratones hembras SOD1-G93A en el total de la muestra estudiada (gráfico superior) y entre las hermanas de camada (gráfico inferior). Muestra total de hembras ($n=30$), no aparecen diferencias significativas entre las hembras tratadas y las no tratadas ($p=0,54$ y Tasa de riesgo relativo=0,8203. Hembras hermanas de camada ($n=12$), no hay diferencias significativas entre las hembras tratadas y las no tratadas ($p=0,5088$ y Tasa de riesgo relativo=0,9711)

5.3.3 - Debilidad muscular (test de la rejilla):

Todas las hembras SOD1-G93A (tratadas y no tratadas) manifiestan una paulatina debilidad muscular, sin encontrarse entre ellas mayores diferencias en la capacidad para mantenerse prendidas de la rejilla.

En todos los machos SOD1-G93A (tratados y no tratados) la debilidad se manifiesta más rápidamente que en las hembras, pero es en los no sometidos al fármaco donde se observa una acentuada y abrupta pérdida de fuerza muscular desde el inicio del ensayo.

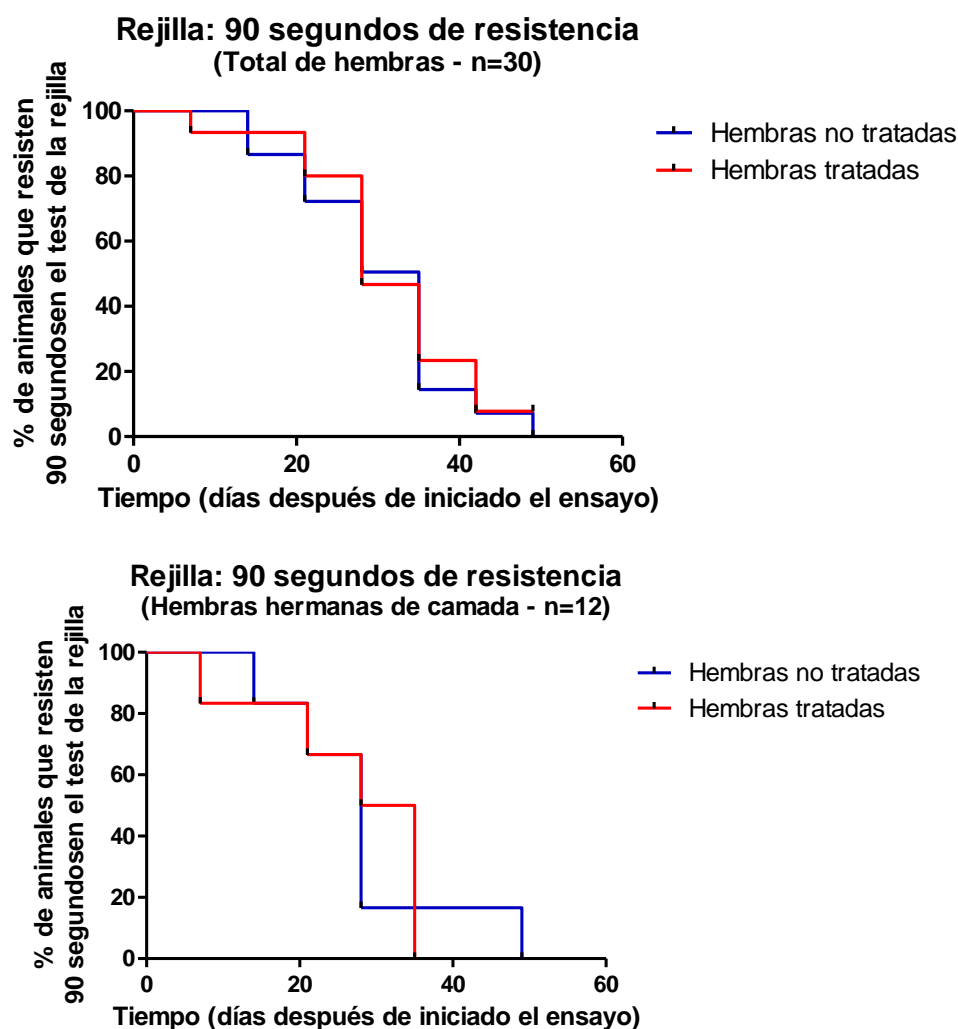


Figura 5.11: Curvas de Kaplan Meier tomando como evento la disminución a la mitad del tiempo de resistencia considerado normal en el test de la rejilla (90 segundos). Se estudian las diferencias entre las hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas con VP1.15, tanto en la muestra total (gráfico superior) como en hermanas de camada (gráfico inferior). No aparecen diferencias significativas entre los grupos considerados de la muestra total ($p=0,6407$ y Tasa de riesgo relativo=1,250), ni entre las hermanas de camada ($p=0,8270$ y Tasa de riesgo relativo=1,180)

Curiosamente, tanto los ratones SOD1-G93A machos y hembras que fueron inyectados con VP1.15, tenían al inicio del ensayo peores medias de resistencia al test que las de los ratones no tratados, pero durante la segunda semana de tratamiento vieron mejorada su habilidad para superarlo. En ambos casos, esto ralentizó la

progresión del deterioro muscular que sigue un patrón aproximadamente lineal a partir de la 3ª semana en todos los casos.

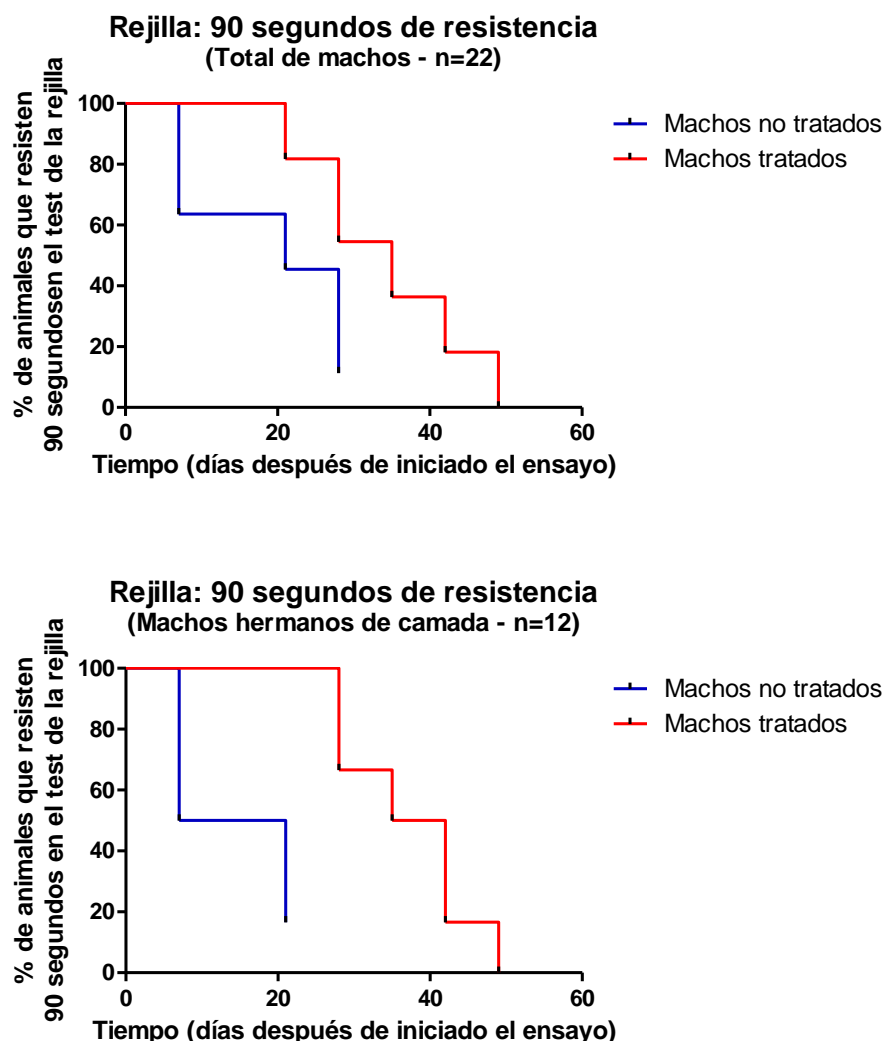


Figura 5.12: Curvas de Kaplan Meier tomando como evento la disminución a la mitad del tiempo de resistencia considerado normal en el test de la rejilla (90 segundos). Se estudian las diferencias entre los machos SOD1-G93A tratados y no tratados con VP1.15, tanto en la muestra total (arriba) como en hermanos de camada (debajo). No aparecen diferencias significativas entre los grupos considerados de la muestra total ($p=0,0198$ y Tasa de riesgo relativo=4,519), ni entre las hermanas de camada ($p=0,0047$ y Tasa de riesgo relativo=16,88)

La incapacidad para mantenerse aferrado a los barrotes de la rejilla se alcanza mayoritariamente durante la 7ª semana. En este momento el 45,45% de los machos SOD1-G93A no tratados sobrevive pero es incapaz de realizar el test, mientras que de los tratados sobrevive el 54,54% pero solo la mitad puede mantenerse entre 8 y 15 segundos en la rejilla. Entre las hembras SOD1-G93A no tratadas, el 86,66% sobrevive y de ellas el 46,15% no puede realizar la prueba. El 100% de las hembras tratadas están vivas pero el 40% es incapaz de mantenerse en la rejilla.

Para analizar la evolución de los ratones frente a este test, hemos considerado realizar curvas de supervivencia tomando como evento la disminución de la resistencia a la mitad de los 3 minutos valorados como el máximo del tiempo estipulado en la literatura (o sea, 90 segundos).

De esta forma hemos encontrado que – **Figuras 5.10 y 5.11; Tablas 5.7 y 5.8 (anexo)**:

- Mientras en el total de hembras SOD1-G93A, no había diferencias significativas entre los grupos sometidos o no al tratamiento con VP1.15 ($p=0,6407$ y Tasa de riesgo relativo= 1,250), en la muestra total de machos SOD1-G93A tratados y no tratados las diferencias eran significativas ($p=0,0198$ y Tasa de riesgo relativo=4,519)
- Lo mismo se reproduce entre hermanos de camada. En las hembras no se encontraron diferencias significativas entre tratadas y no tratadas ($p=0,8270$ y Tasa de riesgo relativo=1,180). En los machos se agudizaron las diferencias llegando a un $p=0,0047$ y a una Tasa de riesgo relativo=16,88.

5.4 - Análisis histológico

Se realizaron cortes histológicos de 20 μ de los siguientes tejidos: músculo gastrocnemius y médula espinal. La tinción de músculo se llevó a cabo con hematoxilina-eosina, y las de médula con Nissl. Se procesaron 2 muestras de animales normales (macho y hembra) y 4 muestras de ratones SOD1 G93A (2 machos y 2 hembras) en cada caso.

No se encontraron mejorías ni en la arquitectura tisular ni en la celular de los ratones SOD1-G93A sometidos a la inyección de VP1.15. Todas las particularidades histológicas observadas corresponden al patrón esperado en la patología, y son las siguientes:

5.4.1 - Atrofia muscular

La hematoxilina es un colorante básico que tiñe de color púrpura o azul las estructuras ácidas celulares (de ahí que identifique los núcleos). Por su parte, la eosina, que es un colorante ácido marca en rosa las estructuras básicas como el citoplasma. El uso combinado de ambos colorantes permite distinguir fácilmente una amplia gama de estructuras tisulares. Aplicando hematoxilina-eosina en los cortes de músculo de los ratones transgénicos SOD1-G93A se observa pérdida de la arquitectura de las fibras musculares y aumento del tejido intersticial con colágeno a expensas de las fibras musculares muertas. No aparecen diferencias evidentes entre machos y hembras tratados y no tratados - **Figura 5.13.**

5.4.2 - Degeneración neuronal en la médula espinal

La tinción de Nissl es una técnica histológica tradicional mediante la cual el Violeta de cresilo (de características básicas) identifica estructuras ácidas celulares. Es ampliamente utilizada en estudios sobre el sistema nervioso porque tiñe específicamente a las neuronas (marca el retículo endoplasmático y los ribosomas interaccionando con el ARN del citoplasma formando lo que se bautizó como “sustancia cromófila”). Utilizando éste método se observó que el asta anterior de la médula de los ratones transgénicos SOD1-G93A aparece con depleción y atrofia de motoneuronas. No se observan variaciones sustanciales entre hembras y machos tratados y no tratados. Se visualizan multitud de motoneuronas atrofiadas en las que tanto núcleo como citoplasma aparecen condensados y su tamaño total es reducido - **Figuras 5.14 y 5.15.**

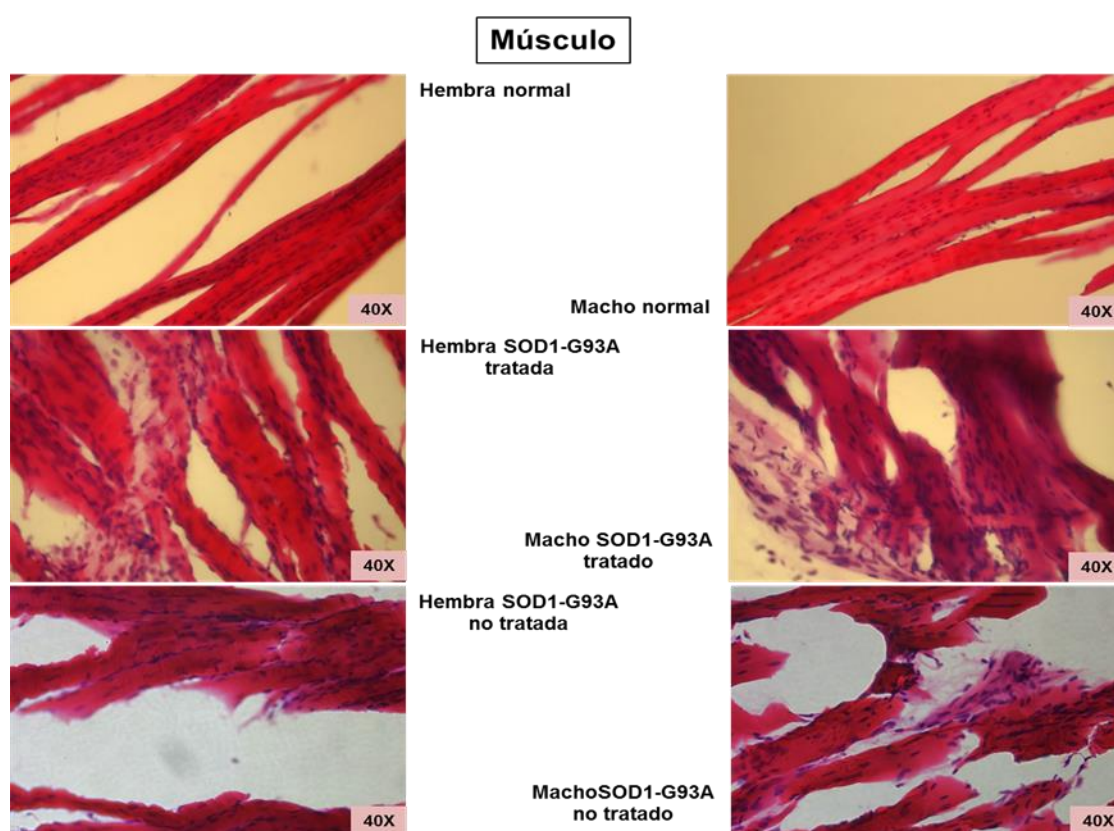


Figura 5.13: Cortes histológicos de músculo gastrocnemius (20 μ), (teñidos con solución de hematoxilina-eosina) de ratones normales y transgénicos SOD1-G93A, diferenciados por sexo. Se observa atrofia muscular tanto en hembras como en machos transgénicos con zonas de abundante colágeno y destrucción de la organización de las fibras. Aumento=400X.

Médula de ratón normal y SOD1-G93A

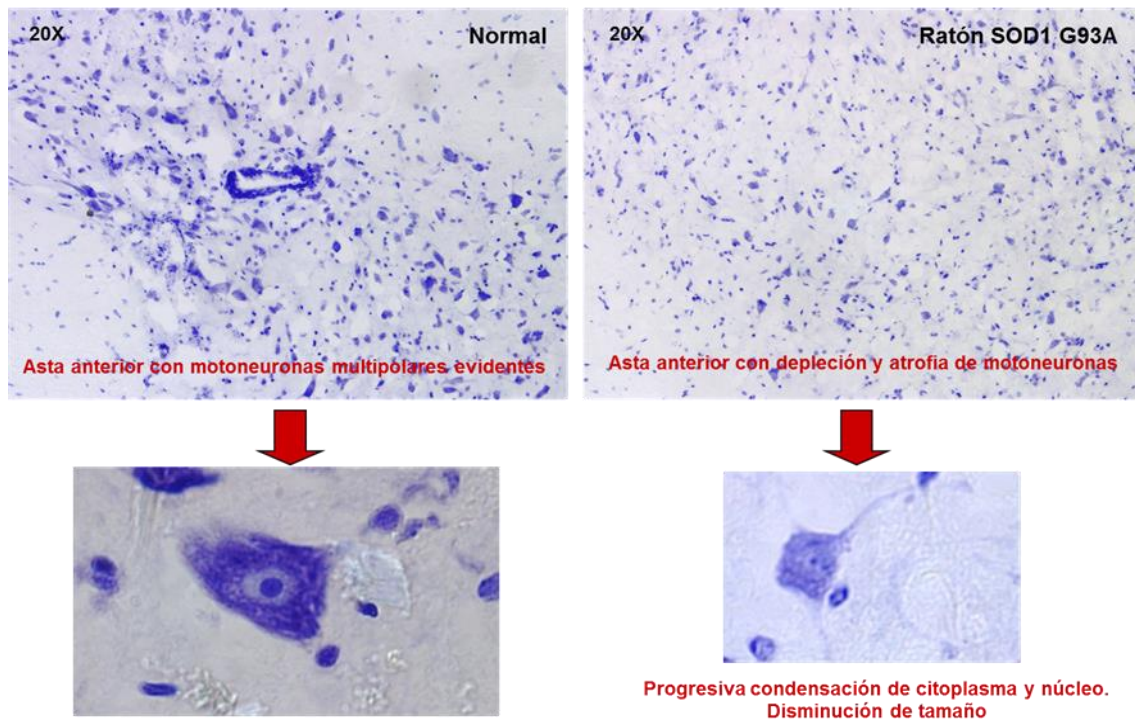


Figura 5.14: Cortes histológicos de médula espinal (20 μ), teñidos con solución de Nissl, de ratones normales y transgénicos SOD1-G93A, con especial relieve en las diferencias encontradas entre las motoneuronas atróficas y las normales. Aumento=200X.

5.4.3 - Astrogliosis en médula espinal

La proteína ácida fibrilar glial (GFAP) forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto y es especialmente abundante en las células gliales, por lo tanto su inmunodetección asegura la identificación de astrocitos. Se realizó, una tinción inmunohistoquímica, marcando con un anticuerpo primario de conejo anti GFAP de ratón y un secundario anti conejo marcado con Alexa 488. En los ratones normales (tanto machos como hembras) no se observa proliferación de astrocitos, la expresión de GFAP (proteína ácida fibrilar glial) es desigual y no se superponen sus dominios. En cambio, en todos los ratones SOD1-G93A, sin distinción de sexo y sometidos o no a tratamiento, aparece una evidente proliferación GFAP+, los astrocitos son intensa y homogéneamente picnóticos, con superposición de dominios, y áreas de cicatrización donde se infiere muerte neuronal. Dado que no se observan diferencias claras entre sexos y tratamientos a nivel microscópico, se realiza la comparación de expresión de GFAP mediante western blot en el encéfalo y la médula de los ratones. Este análisis se tratará más adelante pero

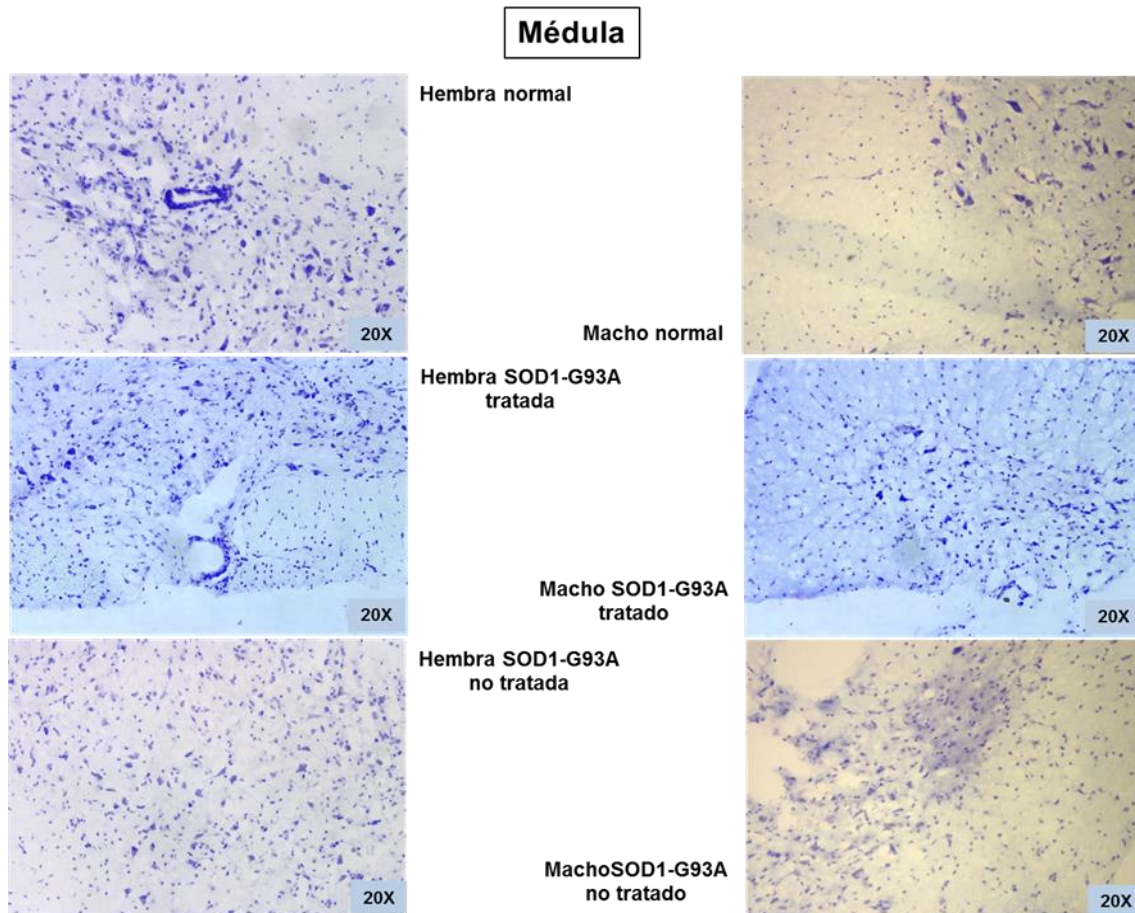


Figura 5.15: Cortes histológicos de médula espinal (20 μ), teñidos con solución de Nissl, de ratones normales y transgénicos SOD1-G93A, diferenciados por sexo. Se observa disminución en la cantidad y tamaño de las motoneuronas. Aumento=200X.

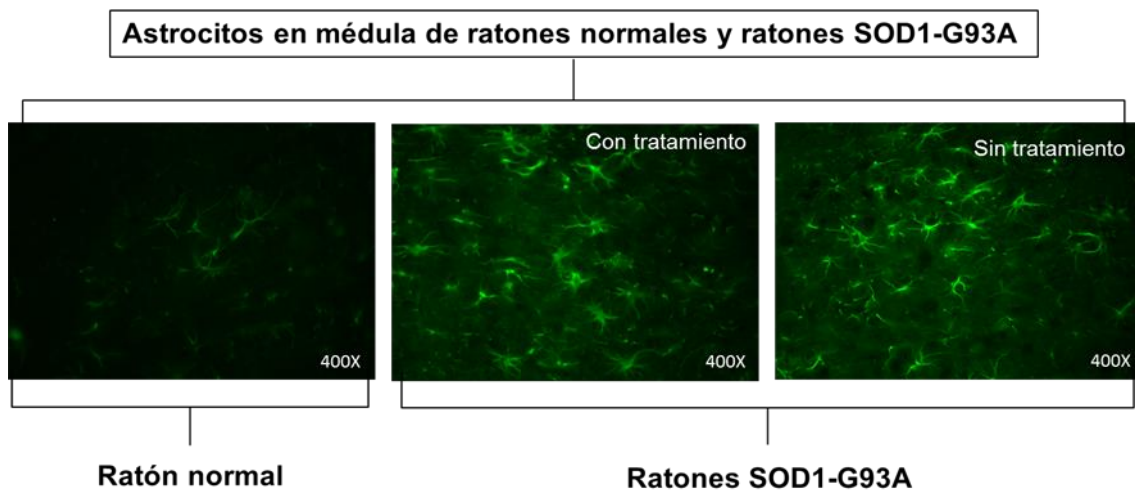


Figura 5.16: Inmunohistología de médula de ratones transgénicos SOD1-G93A y ratones normales. Anticuerpos utilizados: Anticuerpo de conejo anti GFAP de ratón (dilución 1:1000) y anticuerpo anti conejo marcado con Alexa 488 (dilución 1:1000). Aumento=400X.

se anticipa que en médula, el nivel de expresión de GFAP en los animales tratados (independientemente de que sean hembras o machos) está disminuido - **Figura 5.14**

Previamente, en nuestro laboratorio se realizaron cultivos primarios de astrocitos con el fin de estudiar si estaba afectada su dinámica mitocondrial al presentar la mutación SOD1-G93A. La tinción con anticuerpos anti GFAP de esos cultivos no mostraron evidencias morfológicas de alteración respecto a los astrocitos normales.

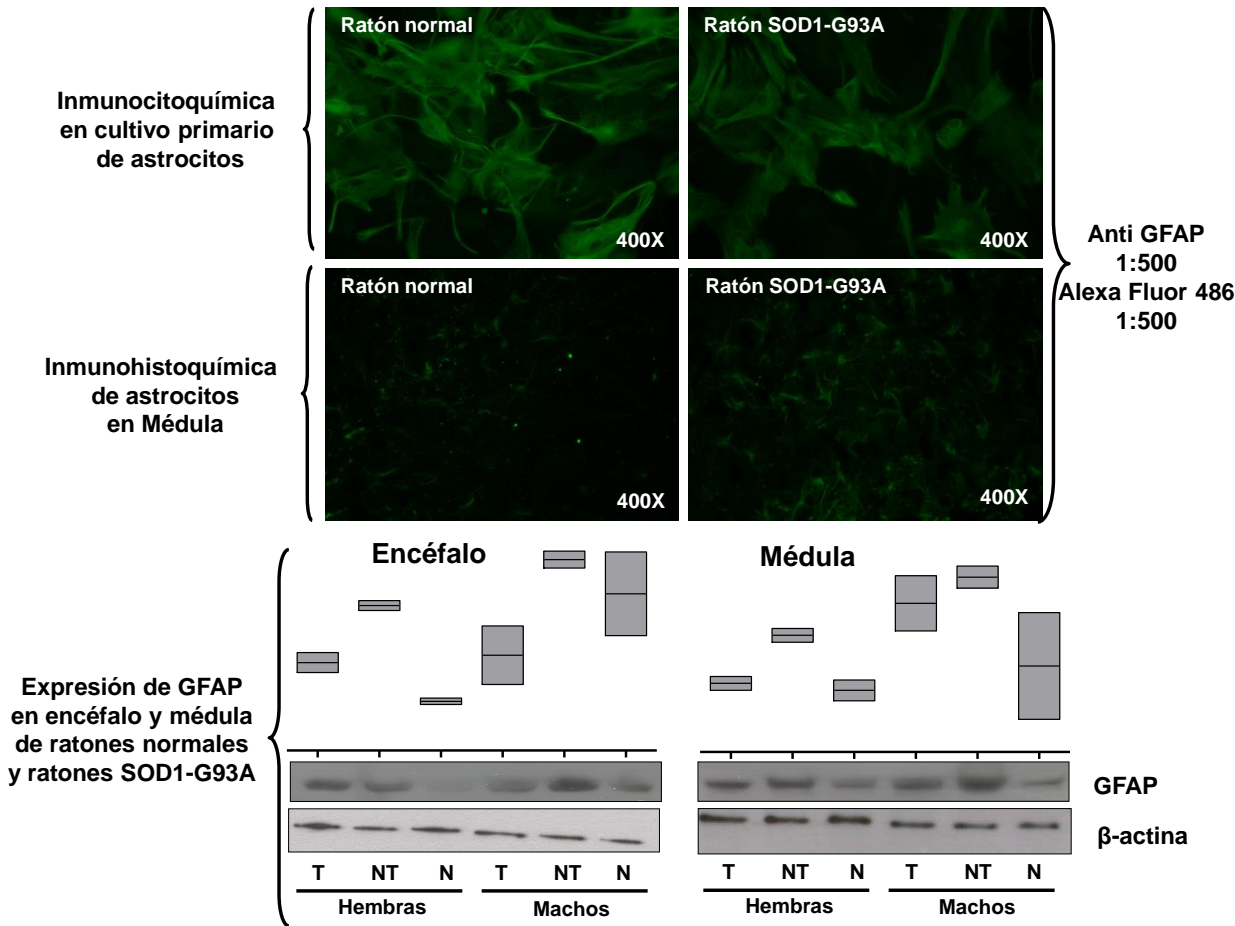


Figura 5.17: La observación por inmunohistoquímica de las diferencias respecto a la neuroinflamación de los ratones SOD1-G93A no es evidente. Mediante western blot se observan las diferencias del nivel de expresión del principal marcador de astrocitos: GFAP.

5.6 - Fragmentación de la red mitocondrial en astrocitos

Las mitocondrias son las organelas especializadas en la producción de energía celular, de ahí que su alteración indique que está disminuida la capacidad de supervivencia y proliferación de las células que las portan. Se trata de organelas plásticas y móviles, que muestran además heterogeneidad morfológica. Su forma depende del momento del ciclo celular, el estado de la célula, su desarrollo, su diferenciación y obviamente del estado patológico.

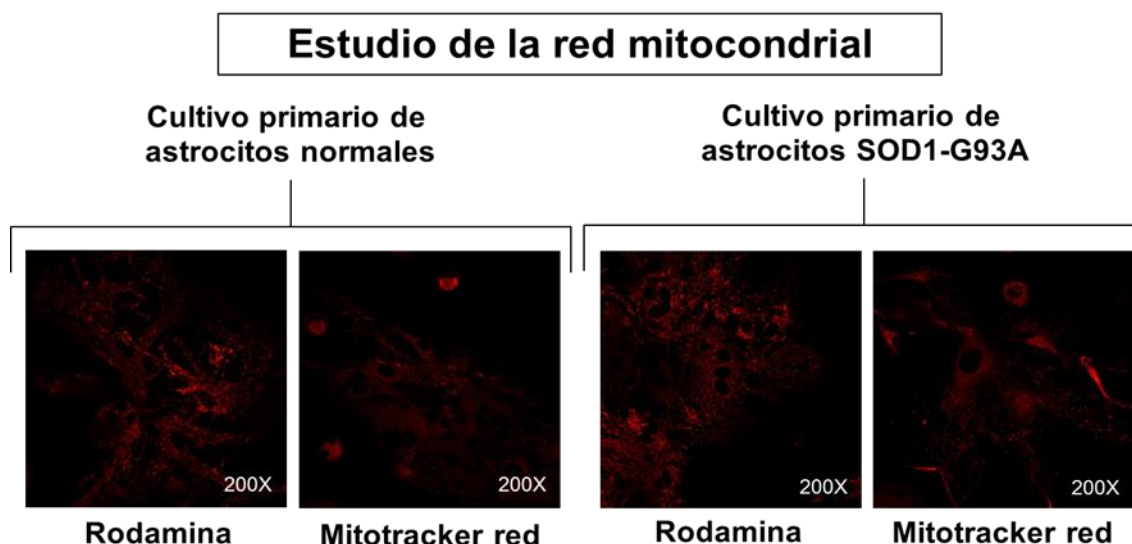


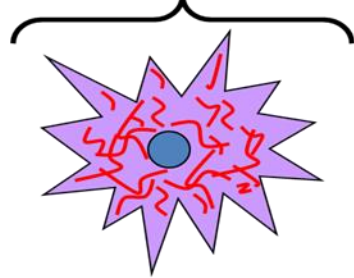
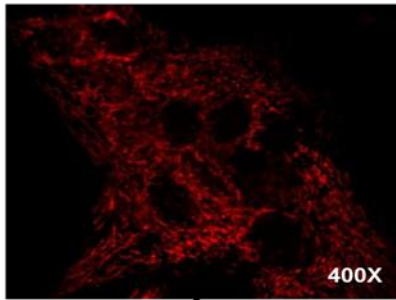
Figura 5.18: Microfotografías de la red mitocondrial en cultivo primario de astrocitos de ratones normales y transgénicos SOD1-G93A con Mitotracker red y Rodamina a 200X y 400X. Se observan mayores detalles mediante la tinción con Rodamina.

La Rodamina 123 y el Mitotracker red (CMXRos) son colorantes utilizados por ser buenos marcadores mitocondriales en células vivas. Ambos se utilizan para observar el estado de la red mitocondrial. A pH fisiológico están cargados positivamente, y por esta razón pueden interaccionar con el relativamente negativo potencial eléctrico de la membrana mitocondrial.

La Rodamina 123 se excita a una longitud de onda de 507 nm y emite fluorescencia roja excitándose a 529 nm. En cambio el MitoTracker red tiene una excitación máxima a 578 nm y una emisión máxima a 599 nm (www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-dyes/).

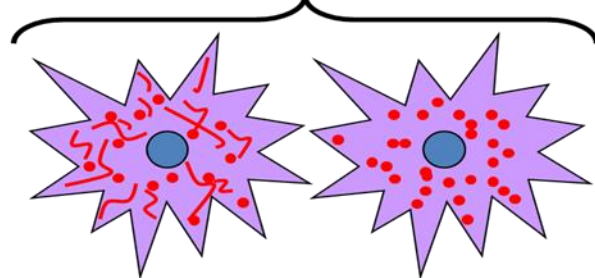
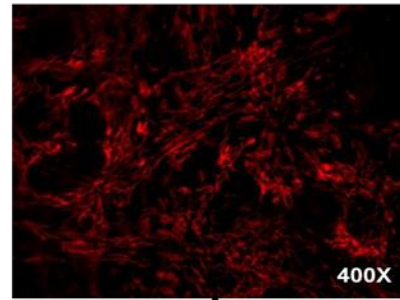
Como se mencionó antes, en un estudio previo evaluamos el estado de fragmentación mitocondrial en cultivos primarios de astrocitos. Dichos cultivos fueron clasificados como derivados de ratones normales o de ratones transgénicos SOD1-G93A mediante PCR antes de la disgregación de los cerebros en medio DMEM 10% SFB. De tal forma que cuando la confluencia lo permitió, se agregó Mitotracker red y Rodamina al medio y se los observó bajo microscopio confocal - **Figuras 5.15 y 5.16.**

Cultivo primario de astrocitos
normales
Rodamina



Mitocondrias filamentosas

Cultivo primario de astrocitos
SOD1-G93A
Rodamina



Mitocondrias fragmentadas y puntuadas

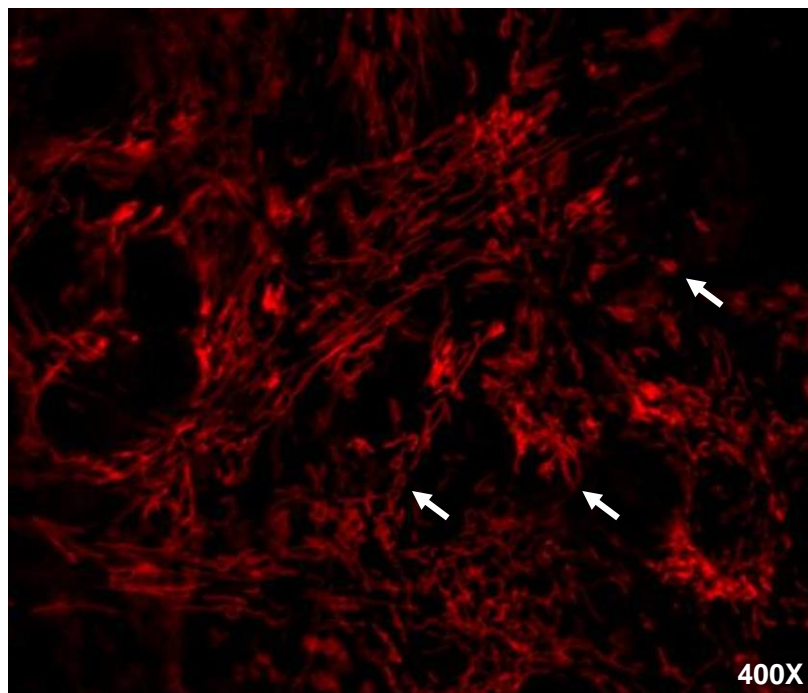


Figura 5.19: Microfotografía de la red mitocondrial en cultivo primario de astrocitos de ratones transgénicos SOD1-G93A con Rodamina. Con esta tinción se observan acúmulos puntuados y estructuras circulares que indicarían fisión mitocondrial.

La observación al microscopio no permitió distinguir si la red mitocondrial en los astrocitos SOD1-G93A estaba afectada. Algunos procesos anulares y puntuados sugieren de forma no concluyente que aparece parcialmente fragmentada.

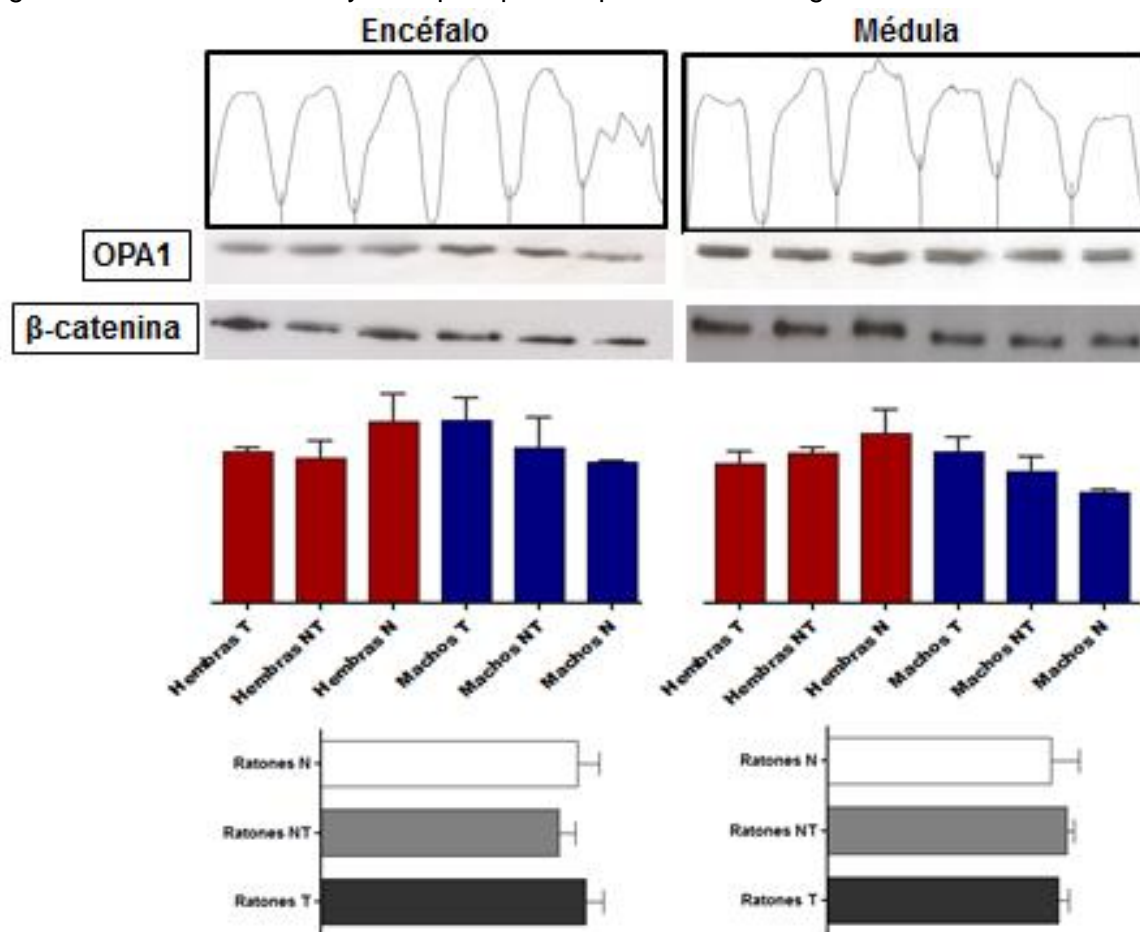


Figura 5.20: Análisis de la expresión de OPA1 en encéfalo y médula de ratones normales y transgénicos SOD1-G93A mediante western blot.

Para trasladar estas observaciones al modelo SOD1-G93A y estudiar si los mecanismos de fusión y fisión mitocondrial estaban afectados en los ratones tratados o no con VP1.15, se realizó mediante western blot la comparación de los niveles de expresión de OPA1 (una proteína mitocondrial que regula estos procesos) tanto en encéfalo como en médula. Al utilizar el test de Kruskal-Wallis no se encontraron variaciones significativas entre géneros y tratamientos en ninguno de los tejidos estudiados (encéfalo y médula), pero es evidente una disminución de la expresión de OPA1 en las hembras tratadas (especialmente en encéfalo)- **Figura 5.17**

Se puede concluir entonces, que el tratamiento con VP1.15 en las hembras no facilitaría los procesos de fusión mitocondrial, y promovería la apoptosis y la mitofagia.

5.7 - Estudio de concentración de AMPc

El AMPc es un segundo mensajero que participa en muchos mecanismos de señalización en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y microglía, (sinapsis, comunicación entre neuronas y glía, y procesos inflamatorios). Se sabe que un aumento de los niveles de AMPc en cultivos de ganglio dorsal, facilita el crecimiento celular aún en presencia de inhibidores asociados a la mielina (proteínas que inhiben la regeneración axónica en el SNC)(130) y además activa a la Protein kinasa A (PKA) e induce la expresión mediada por CREB de genes asociados al crecimiento, (por ejemplo la Arginasa I implicada en el crecimiento de las neuritas)(131).

La concentración de AMPc intracelular está regulada por su síntesis a través de la adenilato ciclasa y su degradación mediante las fosfodiesterasas. Así, la inhibición de estas últimas enzimas lleva a incrementar sus niveles.

Se sabe que el Rolipran (un inhibidor de la fosfodiesterasa incrementa la regeneración de los axones serotoninérgicos de tejido embrional espinal y disminuye la gliosis reactiva (132,133) de este modo consideramos evaluar el efecto de VP1.15 sobre el nivel de AMPc en los tejidos extraídos de los ratones SOD1-G93A que participaron del ensayo.

El estudio de AMPc en encéfalo, músculo e hígado se realizó utilizando 6 muestras de ratones hembra SOD1 G93A y 6 muestras de ratones macho SOD1 G93A tratados y no tratados con VP1.15, más 4 muestras de ratones normales (2 muestras de hembras y 2 muestras de machos). El estudio en médula se realizó con 3 muestras por cada condición de tratamiento (con o sin VP1.15) en hembras y machos SOD1 G93A, 2 muestras de hembras normales y 2 de machos normales.

5.7.1 - Encéfalo

No aparecen diferencias significativas tanto entre las hembras SOD1-G93A tratadas y no tratadas ($p=0,5887$ según el Test Mann Whitney) como en los machos SOD1-G93A tratados y no tratados ($p=0,6874$ según el Test Mann Whitney). Lo mismo aparece entre las hembras y machos transgénicos SOD1-G93A ($p=0,0779$ y $p=0,3265$ respectivamente) y cuando se analiza el conjunto de los ratones muestreados ($p=0,1852$), según el Test Kruskal Wallis - **Figura 5.18 y Tabla 5.8**.

Es evidente una amplia dispersión de los datos en las hembras transgénicas (la media obtenida para las no tratadas es igual a 2,148 con una desviación estándar de 1,136; mientras que para las tratadas se encontró una media de 1,961 con un desviación estándar de 0,9531).

Es llamativo también, que la concentración de AMPc en los machos (ya sea transgénicos como normales) sea muy baja respecto a la de las hembras.

5.7.2 - Médula

No hay diferencias significativas entre ratones transgénicos SOD1-G93A tratados y no tratados, ni en hembras ($p=0,4$), ni en machos ($p=1$), sometiendo el análisis al test de Mann Whitney. Tampoco aparece significación estadística (Kruskal Wallis) en los transgénicos SOD1-G93A comparados con sus congéneres normales

($p=0,5738$ en hembras, $p=0,9862$ en machos), ni en la población total de ratones SOD1-G93A muestreada ($p=0,7784$).

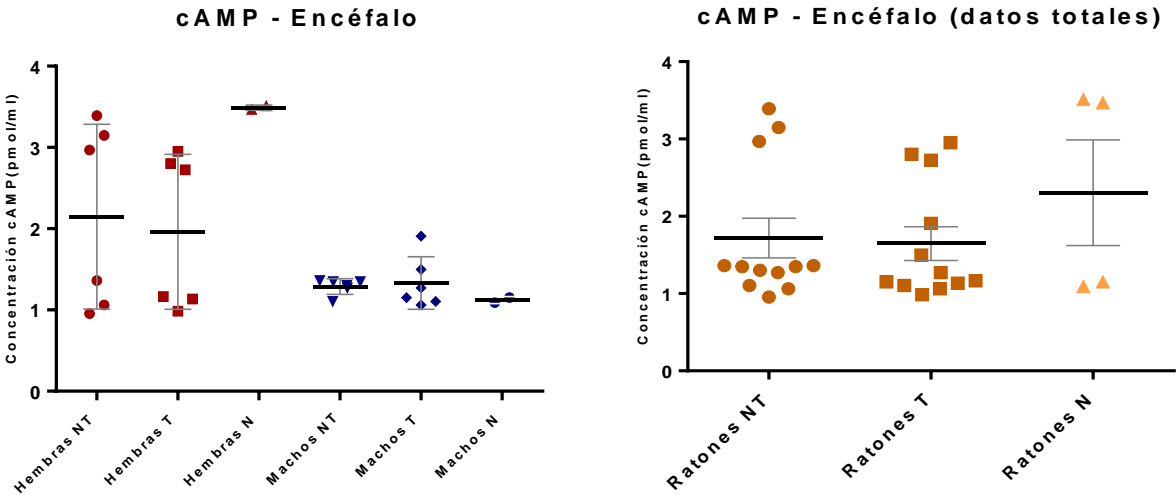


Figura 5.21: Niveles de concentración de AMPc en encéfalo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

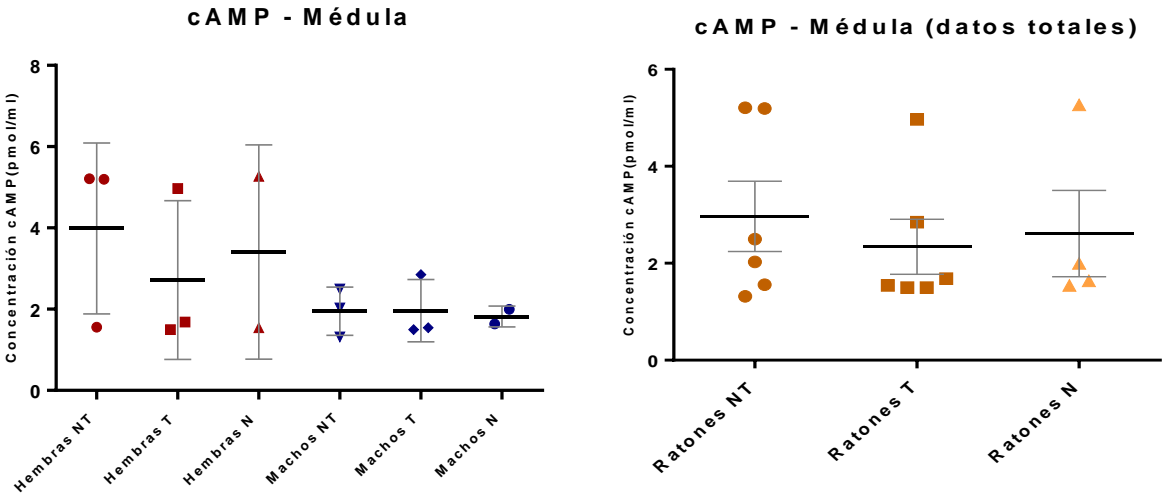


Figura 5.22: Niveles de concentración de AMPc en médula de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

Nuevamente aparece una notable dispersión de los datos en las hembras. Las medias obtenidas son de 3,988, 2,716 y 3,407 en no tratadas, tratadas y normales; con un desviación estándar de 2,103, 1,952 y 2,634 respectivamente - **Figura 5.19 y Tabla 5.8**. Los machos (transgénicos o no), igual que se observaba en el encéfalo, presentan concentraciones de AMPc inferiores a las de las hembras.

5.7.3 - Músculo

En músculo tampoco aparecen diferencias significativas analizadas mediante el test de Mann Whitney, entre hembras y machos SOD1-G93A tratados y no tratados ($p=0,6991$ y $p=0,5887$ respectivamente). Mediante el test de Kruskal Wallis se analizó el total de hembras y machos por separado, y el conjunto total de ratones SOD1-G93A y tampoco fueron significativos los resultados ($p=0,8145$ para las hembras, $p=0,1622$ para los machos y $p=0,1053$ para el total de animales muestreados).

Como sucedía en los anteriores tejidos, la dispersión de datos en las hembras es muy elevado y aparece tanto en las transgénicas SOD1-G93A como en las normales (las medias para hembras no tratadas, tratadas y normales fueron de 4,737, 5,075 y 4,293 respectivamente y sus consiguientes desviaciones estándar de 1,719, 2,162 y 1,510) - **Figura 5.20 y Tabla 5.8**.

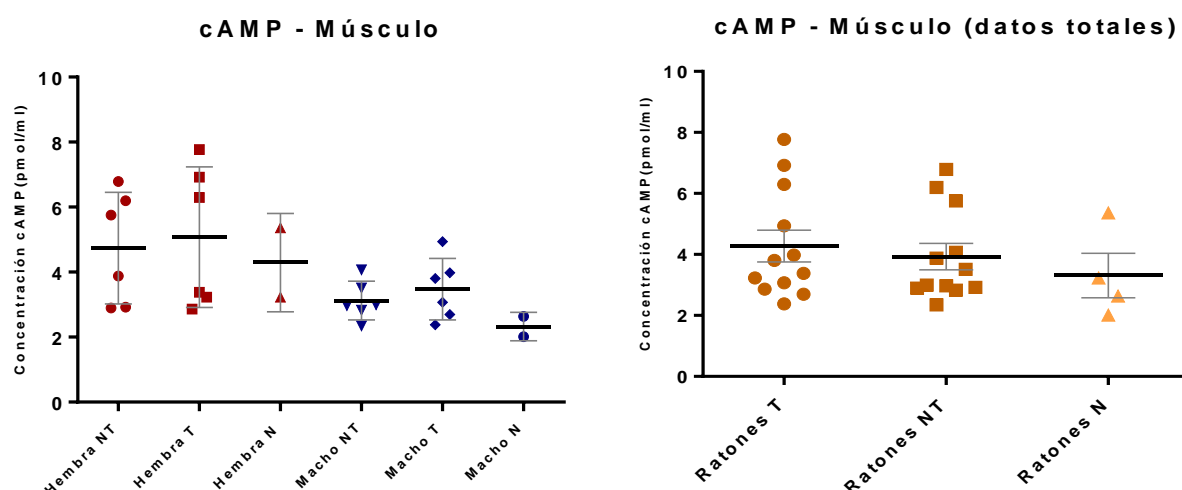


Figura 5.23: Niveles de concentración de AMPc en músculo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.7.4 - Hígado

Finalmente, no se encontraron variaciones en el tejido control. En hígado no hubo diferencias significativas en la concentración de AMPc ni entre las hembras y machos transgénicos SOD1-G93A ($p=0,7$ y $p=0,7066$ respectivamente), ni en el total de hembras y machos ($p=0,8248$ y $p=0,3845$ respectivamente), ni en el total de

animales muestreados ($p=0,1766$).

Como apareció en las anteriores determinaciones, aquí también se repitió la presencia de una importante dispersión de datos en las hembras (en este caso solo se vio en las transgénicas: media de 2,504 y 3,2 con desvío estándar de 1,626 y 1,083 en las no tratadas y tratadas respectivamente) - **Figura 5.21 y Tabla 5.8**.

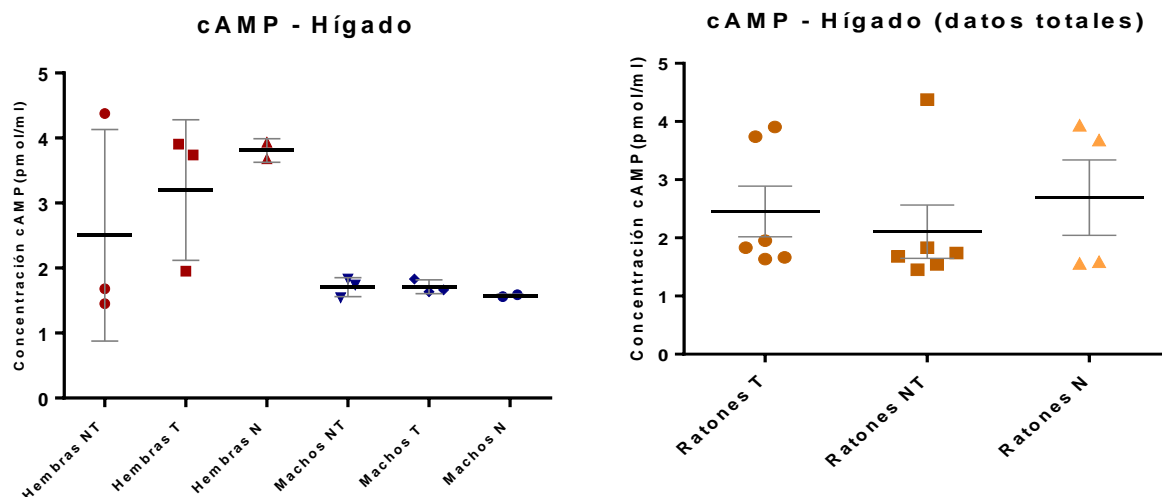


Figura 5.24: Niveles de concentración de AMPc en hígado de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8 - Análisis de expresión de β -catenina y CREB

CREB (CRE binding protein) es un factor de transcripción regulado por AMPc. Se une a secuencias CRE (cAMP response element) del ADN des-reprimiendo genes vinculados a la plasticidad neuronal y la neuroprotección **(90)**. Puede ser fosforilada por PKA y GSK-3 modificando su conformación y facilitando o dificultando respectivamente su unión al ADN **(134)**.

GSK-3 puede inhibirse vía la ruta PKA-AKT en su residuo Ser9, o directamente mediante la presencia de inhibidores como el Litio o el Valproato de Sodio. Se sabe que ambos procesos inhibitorios producen un incremento de la activación de CREB **(95)** y puesto que esta situación es similar a la presentada por VP1.15 se decidió evaluar el nivel de expresión de CREB fosforilada en el residuo Ser133 en los tejidos extraídos de los ratones SOD1-G93A sometidos a estudio. Bajo esta condición CREB está activa y puede interaccionar con los sitios CRE de sus genes diana.

Por otro lado, β -Catenina es parte de la ruta canónica Wnt/ β -Catenina, relacionada con los procesos de proliferación y diferenciación celular y en particular, con el balance entre la supervivencia y la muerte neuronal en enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Alzheimer, la Enfermedad de Huntington y la ELA **(102,110)**.

β -Catenina se regula por fosforilación mediante la Casein kinasa 1 en el residuo Ser-45 y mediante GSK3 en Thr-41, Ser-37 y Ser-33. Cuando esto sucede, β -Catenina se degrada por el complejo ubiquitina-proteosoma. Por lo tanto, la inhibición de GSK3 estabiliza la forma activa de la β -Catenina en el citoplasma y facilita la subsecuente traslocación al núcleo **(135)**.

Por otro lado, GSK3 y β -Catenina se encuentran sobreexpresadas en la corteza frontal y temporal en la ELA con afectación cognitiva **(111)**.

En el momento de sacrificio de los animales se extrajeron enteros los encéfalos y las médulas, y se tomaron muestras de músculo e hígado. Se obtuvieron tejidos de 2 animales según condición (tratados y no tratados), pero considerando además la clasificación según sexo (Hembras tratadas: 2 encéfalos, 2 médulas, 2 músculos y 2 hígados, Hembras no tratadas: 2 encéfalos, 2 médulas, 2 músculos y 2 hígados; Machos tratados: 2 encéfalos, 2 médulas, 2 músculos y 2 hígados, Machos no tratados: 2 encéfalos, 2 médulas, 2 músculos y 2 hígados. Respecto a los ratones normales, se extrajeron 4 muestras de cada uno de los tejidos considerados (2 pertenecientes a hembras y 2 correspondientes a machos).

4.8.1 - Expresión de β -catenina

Se estudiaron los niveles de expresión de β -Catenina activa (defosforilada en S33, S37 y T41) en los diferentes tejidos obtenidos de los animales tratados y no tratados con VP1.15 (2 muestras por cada sexo y tratamiento y 2 muestras correspondientes a hembras y machos normales). El estudio estadístico se realizó en todos los casos mediante el test de Kruskal-Wallis.

4.8.1.1 - Encéfalo

No aparecen diferencias significativas entre hembras y machos transgénicos SOD1-G93A y los correspondientes ratones normales ($p=0,3679$ en hembras y $p=0,6514$ en machos) - **Figura 5.22 y Tabla 5.9**. La expresión de β -catenina en los animales transgénicos parecería disminuida respecto a los valores obtenidos en los ratones normales (ya sean estos, machos o hembras). De ahí que resulte sugestivo encontrar que los machos tratados presenten un ligero incremento de la expresión respecto a los que no fueron tratados con VP1.15.

5.8.1.2 - Médula

No aparecen diferencias significativas entre el grupo de hembras SOD1-G93A ni en el grupo de machos SOD1-G93A ($p=0,4621$ y $p=0,1801$ respectivamente). Es de reseñar que los valores de los machos normales se apartan de forma evidente de los obtenidos en el resto de las muestras.

Los niveles de expresión de β -catenina podrían estar comparativamente tan elevados en las hembras normales debido a una posible regulación hormonal vía estrógenos. - **Figura 5.23 y Tabla 5.9**.

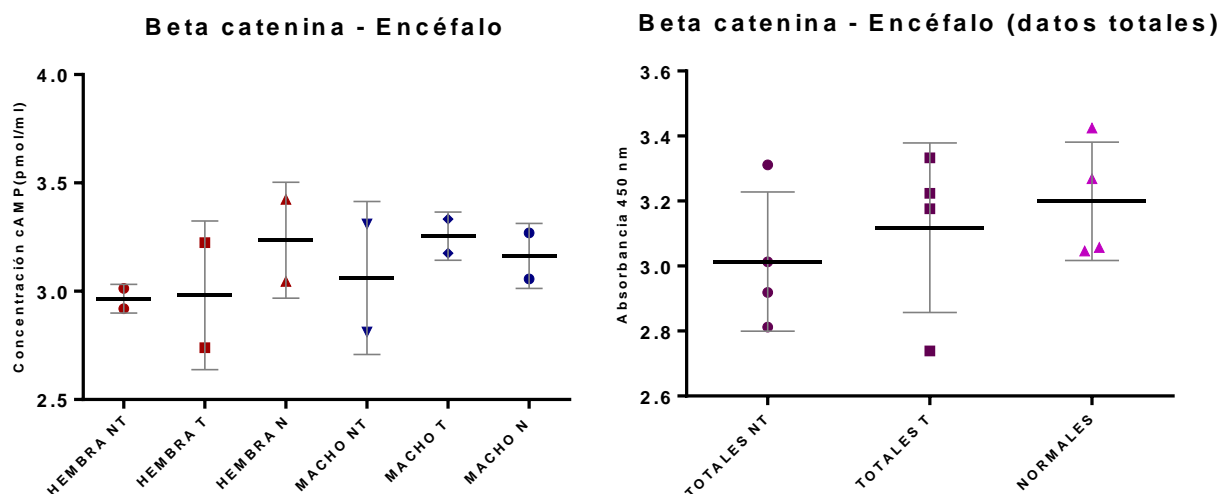


Figura 5.25: Niveles de expresión de β -catenina en encéfalo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

Es importante señalar que cuando se analizan los datos totales sin separar en sexos, la significación asociada a la expresión de β -catenina en médula resulta con una $p=0,0526$. Si bien estadísticamente el resultado aún es no significativo, podría indicar que utilizando un mayor tamaño muestral en una muestra mayor los machos normales tendrían un nivel de expresión mucho menor al encontrado en hembras y también del de los transgénicos.

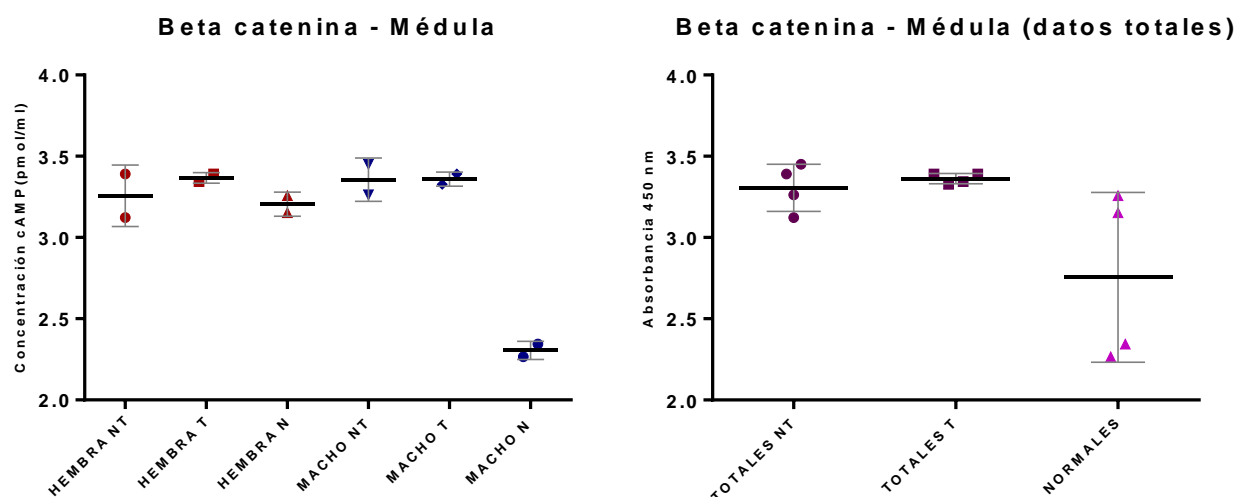


Figura 5.26: Niveles de expresión de β -catenina en médula de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8.1.3 - Músculo

En este tejido no aparecen diferencias significativas ni en hembras (p=0,1801) ni en machos (p=0,1017) - **Figura 5.23 y Tabla 5.9**. Lo mismo ocurre si se analizan los niveles de expresión sobre el total de animales tratados, no tratados y normales.

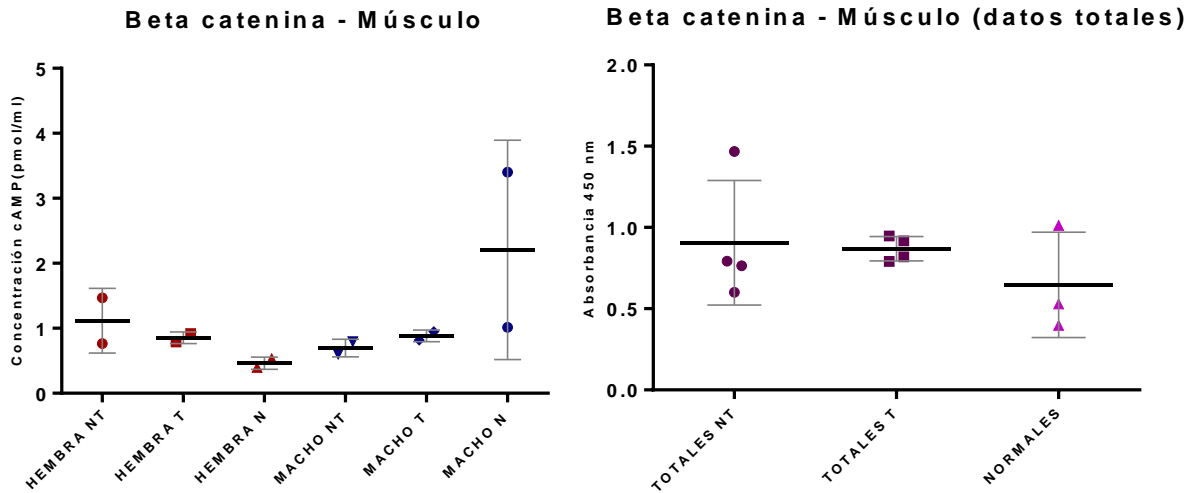


Figura 5.27: Niveles de expresión de β -catenina en músculo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

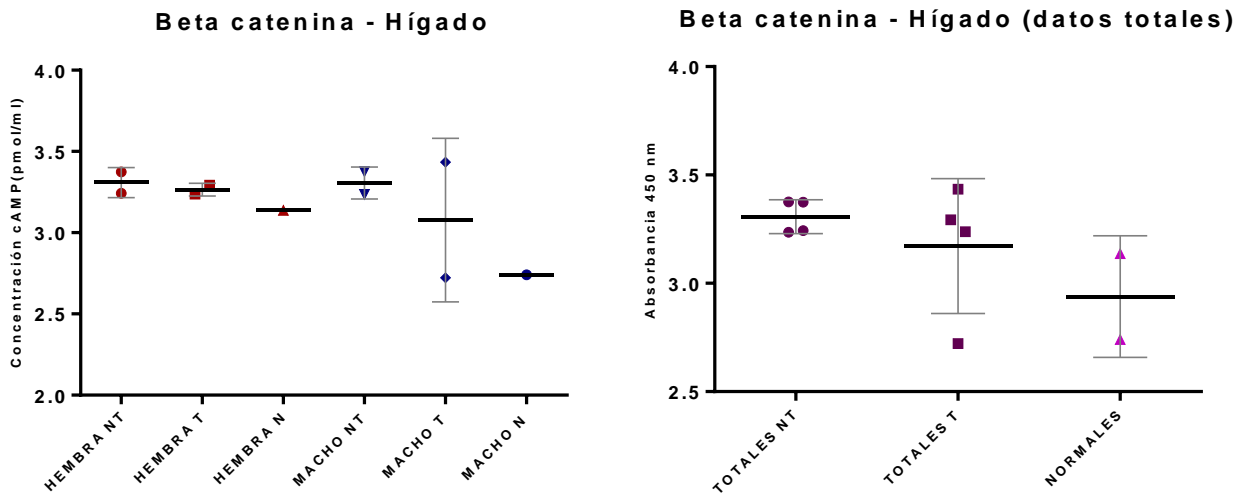


Figura 5.28: Niveles de expresión de β -catenina en hígado de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8.1.4 - Hígado

No hay variaciones significativas en el tejido control ($p=0,3012$ en hembras y $p=0,7408$ en machos) - **Figura 5.24 y Tabla 5.9**. Los valores de expresión de β -catenina aparecen nuevamente disminuidos en los machos normales.

4.8.2 - Expresión de CREB

Se analizaron los niveles de expresión de CREB activa (fosforilada en Ser133) en los distintos tejidos extraídos de los animales sometidos o no a tratamiento con VP1.15, y los correspondientes tejidos normales.

4.8.2.1 - Encéfalo

No aparecen diferencias significativas entre las hembras transgénicas independientemente de si fueron tratadas o no, y las correspondientes hembras normales ($p=0,3679$). Tampoco aparecen diferencias significativas en los machos SOD1-G93A, tratados y no con el inhibidor, ni con los ratones normales ($p=0,3679$) - **Figura 5.25 y Tabla 5.10**. Los valores obtenidos en los datos totales (ratones SOD1-G93A tratados y no tratados respecto a los normales, sin distinción de sexos), tampoco tienen diferencias significativas entre ellos.

Aun cuando el análisis estadístico no avala nuestras observaciones, los dos sexos parecieran comportarse de forma opuesta: los machos transgénicos no tratados tienen valores de expresión de CREB muy bajos respecto a las hembras en igual situación, y no puede afirmarse que el tratamiento se los incrementa. En comparación, las hembras SOD1 G93A presentarían similares niveles de expresión.

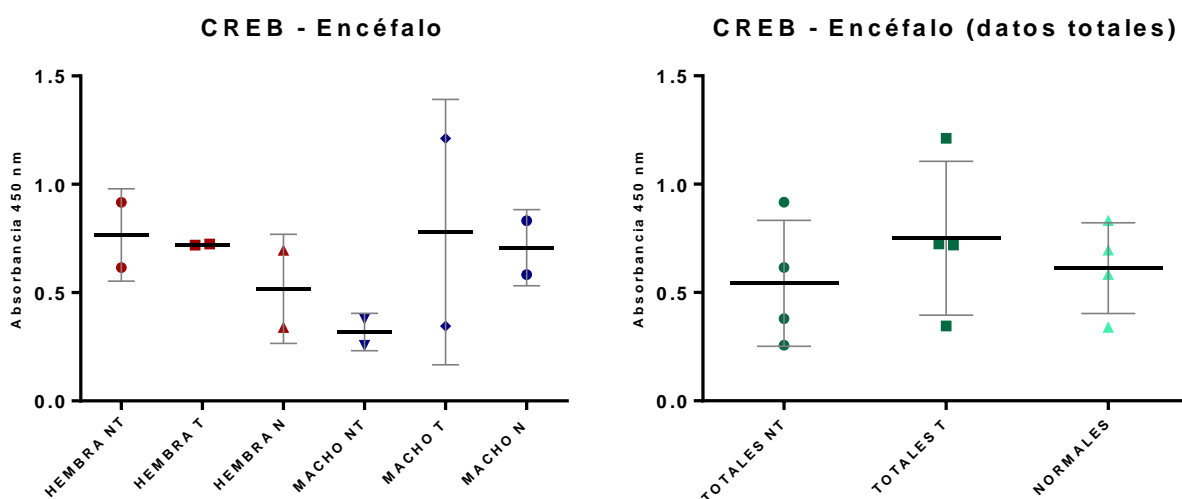


Figura 5.29: Niveles de expresión de CREB en encéfalo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8.2.2 - Médula

El estudio estadístico en médula no arroja diferencias significativas, ni en el grupo de las hembras, ni entre los machos ($p=1$ y $p=0,8669$ respectivamente). Lo mismo se reproduce cuando el análisis se realiza sobre el total de ratones SOD1 G93A tratados, no tratados y normales - **Figura 5.26 y Tabla 5.10**. En este caso no podría afirmarse que existen diferencias en cuanto al comportamiento de CREB en hembras y machos.

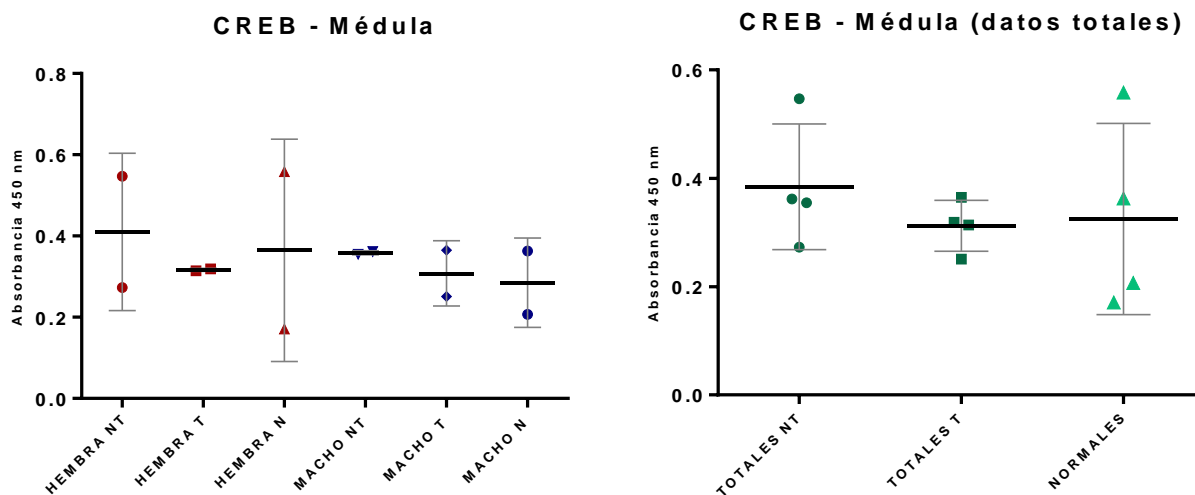


Figura 5.30: Niveles de expresión de CREB en médula de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

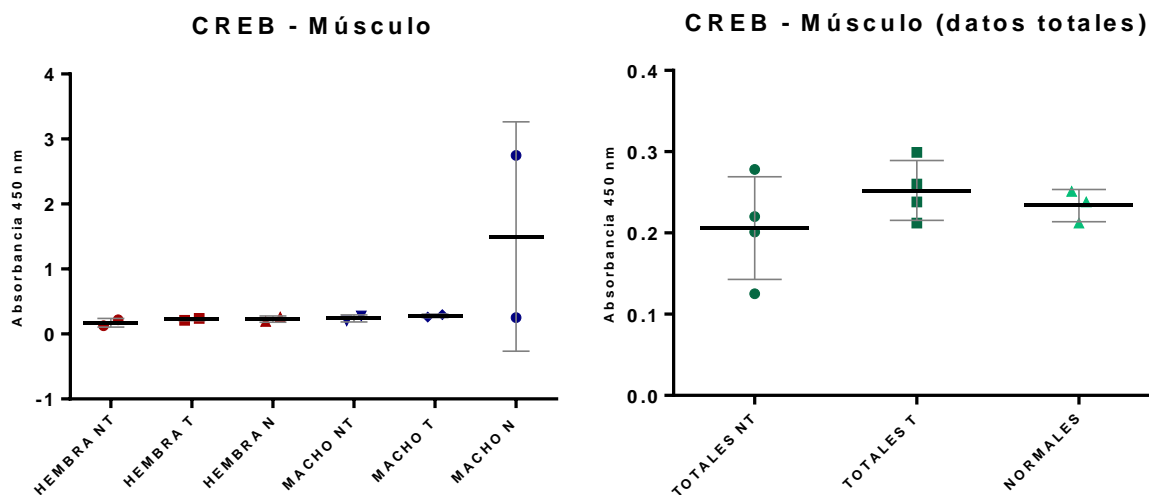


Figura 5.31: Niveles de expresión de CREB en músculo de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8.2.3 - Músculo

No aparecen diferencias significativas en los músculos de las hembras SOD1-G93A ni en el de los machos SOD1-G93A (en ambos casos, $p=0,6514$) - **Figura 5.27 y Tabla 5.10**. No obstante es evidente que los niveles de expresión de CREB en músculo no se ven afectados por la patología.

En todos los casos (ratones transgénicos y normales), sus valores son sorprendentemente semejantes (en el caso de los machos normales, uno de los valores obtenidos es muy alto, y aunque no puede descartarse se infiere que ha sido fruto de un error durante la técnica de cuantificación).

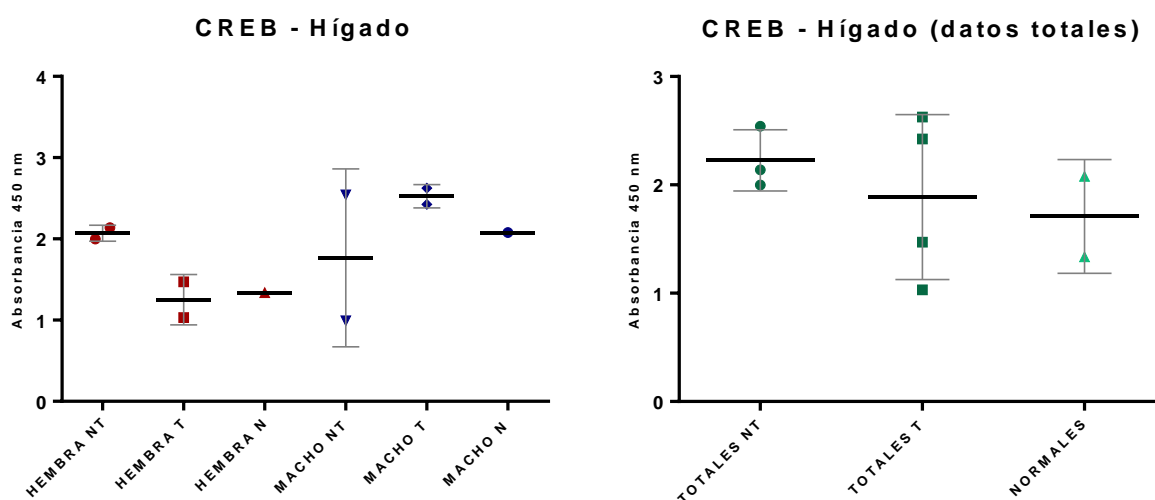


Figura 5.32: Niveles de expresión de CREB en hígado de ratones SOD1-G93A y normales, según tratamiento y sexo.

5.8.2.4 - Hígado

En este tejido no aparecen diferencias significativas, ni en las hembras, ni en los machos ($p=0,2231$ y $p=0,4966$) - **Figura 5.28 y Tabla 5.10**, pero aquí aparecen también diferencias intergenéricas: hembras y machos normales parecen tener diferencias en cuanto a la expresión de CREB en hígado. Los transgénicos tratados (machos y hembras) tenderían a manifestar niveles de expresión cercanos a los valores normales de su sexo.

5.9 - Expresión de las enzimas GSK-3 y PDE-7

Se analizaron mediante western blots las expresiones de GSK-3 α/β (forma activa de la enzima), de pSer9 GSK-3 β (forma inactiva de la enzima) y de PDE7b, para verificar que efectivamente el inhibidor VP1.15 ejerció su acción sobre las rutas celulares estudiadas.

A su vez, dado que los procesos neuroinflamatorios son típicos de todas las enfermedades neurodegenerativas y también de la ELA, se estudiaron los niveles de astrogliosis mediante la cuantificación de la expresión de GFAP – **Figura 3.28**.

En ambos casos se estudiaron 2 muestras de encéfalo y 2 muestras de médula por cada tipo de tratamiento y sexo. El mismo número de muestras se empleó en los controles normales.

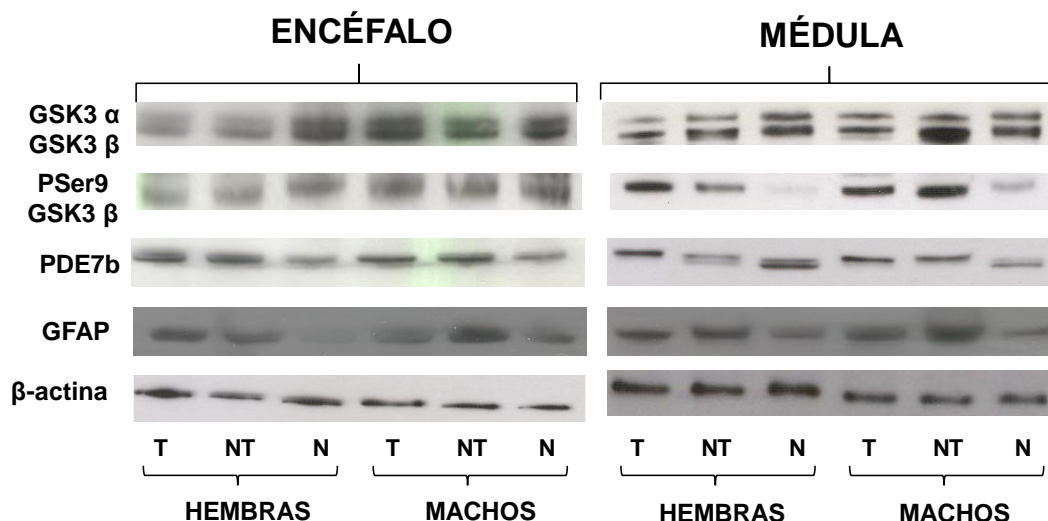


Figura 5.33: Niveles de expresión de GSK3, P Ser9-GSK3, PDE7b y GFAP mediante western blot. T: Tratados - NT: No tratados - N: Normales

5.9.1 - Expresión de GSK-3 fosforilada y defosforilada en Ser9

En el encéfalo no parecen encontrarse diferencias de expresión a nivel de Ser9-GSK-3 en los ratones SOD1-G93A, ni en sus homólogos normales.

Sin embargo, en la médula aparecen diferencias claras de expresión en Ser9 GSK-3, que aparece francamente disminuida en las hembras SOD1-G93A no tratadas y, en las hembras y machos normales.

Es interesante encontrar que los machos transgénicos no tratados con VP1.15 tienen incrementado el nivel de expresión de la forma activa de GSK-3β, y dado que la expresión de la forma fosforilada de GSK-3 no varía entre tratados y no tratados, se puede inferir que la acción del fármaco es positiva para ellos.

El nivel de expresión de P Ser9 GSK3 en médula está incrementado tanto en los machos SOD1-G93A tratados como en las hembras SOD1-G93A tratadas (Incremento relativo en hembras = 401,67% e Incremento relativo en machos = 272,34%. Incremento relativo total = 325,37%), y es significativo ($p = 0,0183$) considerando el total de animales transgénicos tratados con VP1.15 de los que no lo fueron. La forma activa de GSK3 β está aparentemente disminuida (el porcentaje medio de disminución es de 87,9% en los ratones SOD1-G93A no tratados aunque en las hembras no sometidas al VP1.15 llega al 59,9%, y en los machos tratados alcanza el 122,4%). Por otro lado, se encontraron efectos opuestos a nivel de la expresión de

P Ser9 GSK3 en el encéfalo: en este tejido también se observó una disminución de la enzima inactivada (El porcentaje medio de disminución es de 84,39% en los ratones no tratados y de 73,13% en los tratados, así como el 69,15% en las hembras tratadas y el 77,35% en machos tratados) - **Figuras 5.29 y 5.30 – Tablas 5.11 y 5.14.**

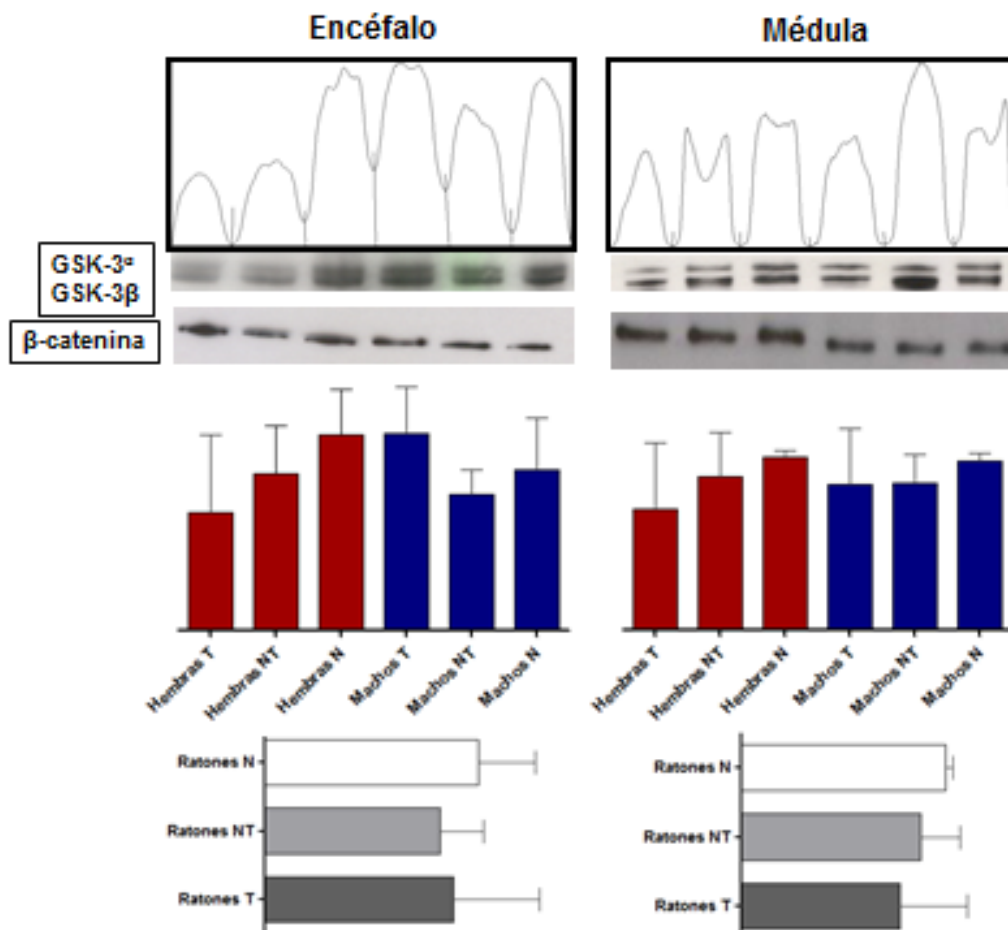


Figura 5.34: Niveles de expresión de GSK-3α/β en encéfalo y médula de los ratones SOD1-G93A y normales estudiados, según tratamiento y sexo.

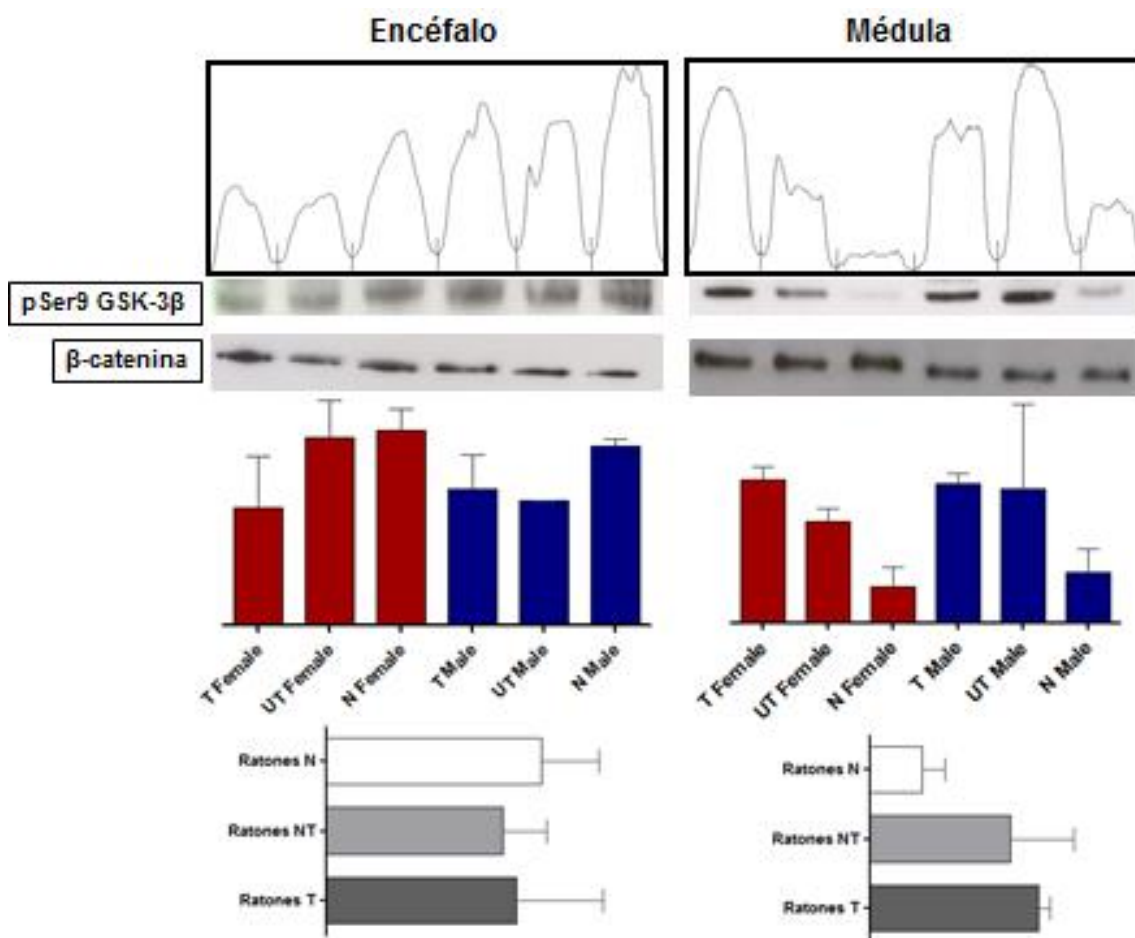


Figura 5.35: Niveles de expresión de pSer9 GSK-3β en encéfalo y médula de los ratones SOD1-G93A y normales estudiados, según tratamiento y sexo.

4.9.2 - Expresión de PDE-7

La expresión de PDE-7 está incrementada en el encéfalo de los ratones SOD1-G93A (el incremento relativo en ratones no tratados es del 188,11% y de 187,61% en los ratones tratados).

No se encontraron valores de expresión anormales en la médula del total de ratones tratados o no con VP1.15, pero al evaluar lo que sucede en cada sexo se encuentra que los machos tratados muestran un incremento de su expresión respecto a las hembras tratadas (Incremento relativo = 177,19% en machos tratados, e Incremento relativo = 66% en hembras tratadas) - **Figura 5.31 y Tablas 5.12 y 5.14.**

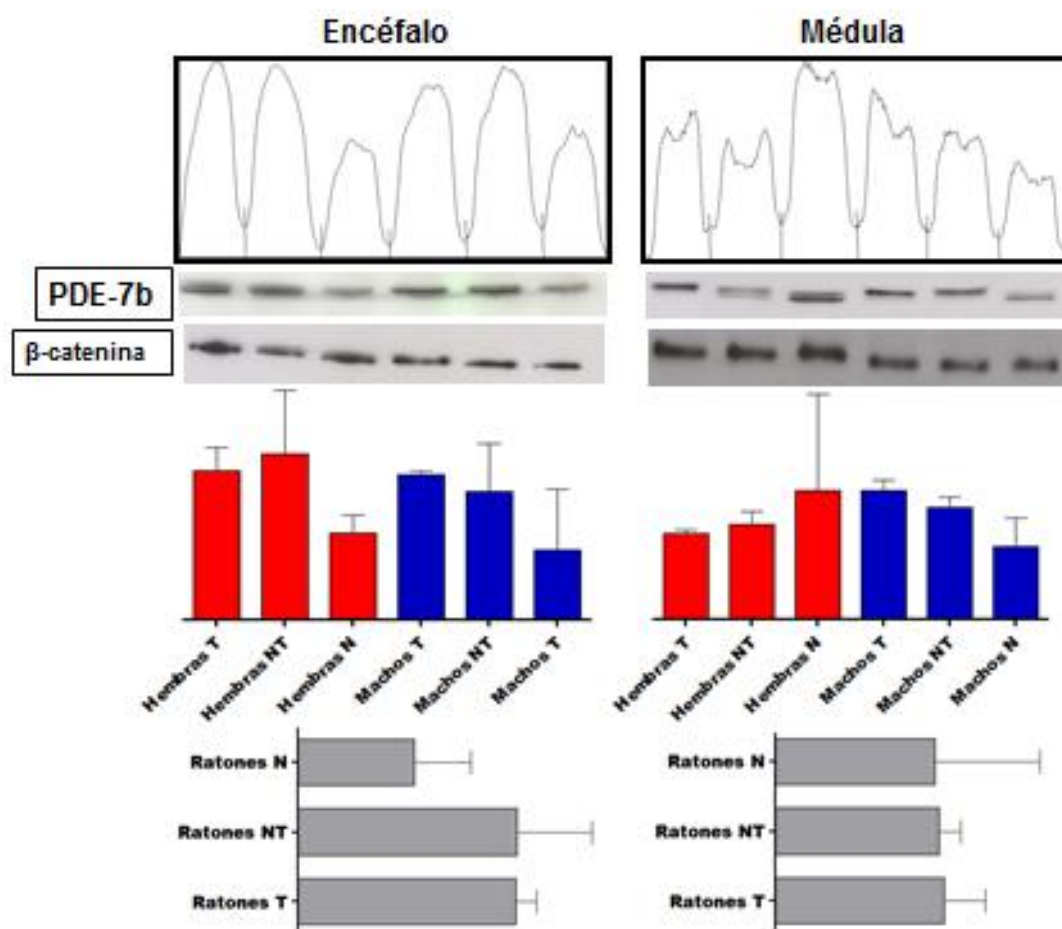


Figura 5.35: Niveles de expresión de PDE-7 en encéfalo y médula de los ratones SOD1-G93A y normales estudiados, según tratamiento y sexo.

5.9.3 - Expresión de GFAP

Se observa sobreexpresión de GFAP en todos los ratones transgénicos SOD1-G93A, independientemente de su sexo. No aparecen mayores diferencias en médula, pero en encéfalo es evidente una expresión mayor en las hembras respecto a los machos (independientemente del tratamiento que hayan recibido) – **Figura 5.32; Tablas 5.13 y 5.14.**

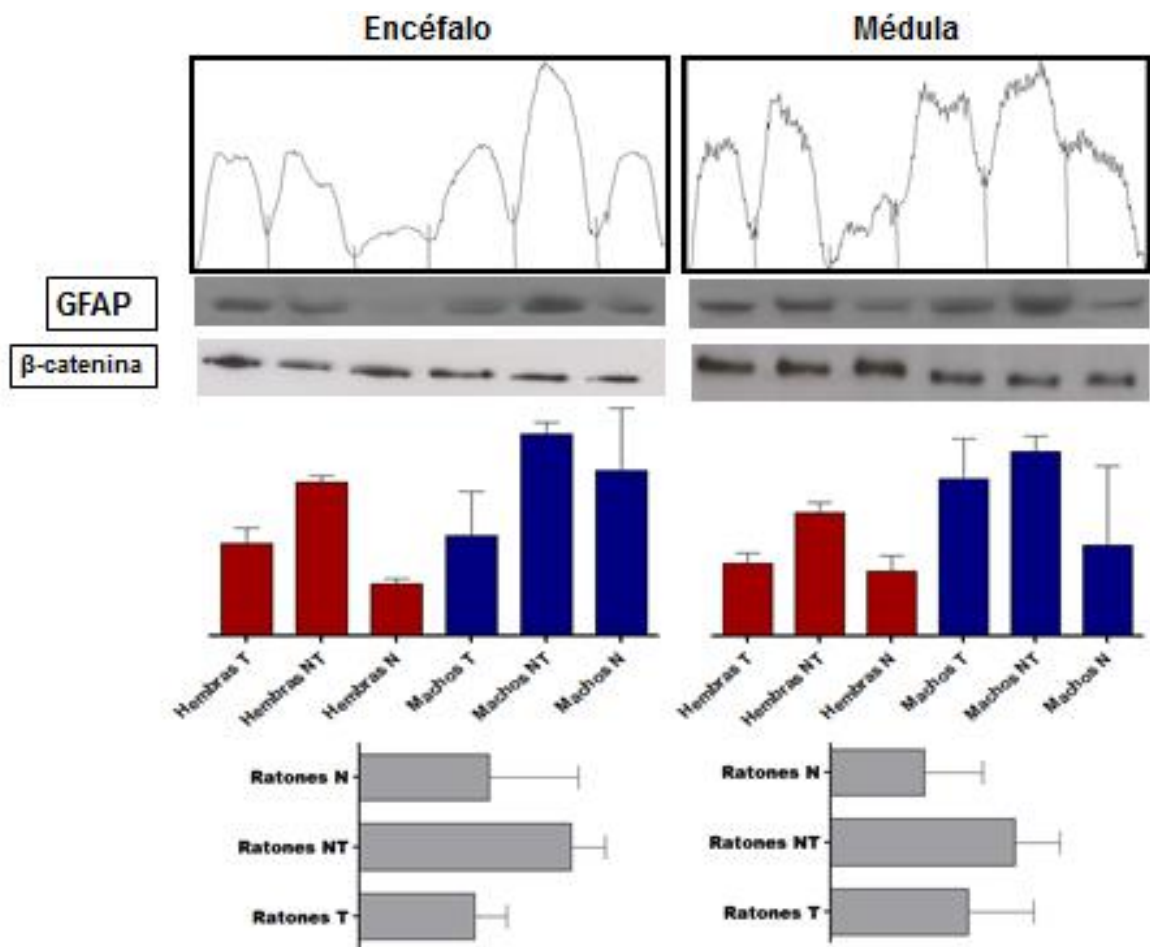


Figura 5.36: Niveles de expresión de GFAP en encéfalo y médula de los ratones SOD1-G93A y normales estudiados, según tratamiento y sexo.

DISCUSIÓN

6.1 - Eficacia de VP1.15 respecto a la supervivencia y la evolución de la enfermedad

En este trabajo, se hace evidente que los ratones transgénicos SOD1-G93A machos tuvieron peores resultados en las pruebas de resistencia al esfuerzo y evaluación neurológica que las hembras. Comparativamente también perdieron peso más rápido y su tasa de supervivencia fue menor, a menos que se trataran con VP1.15.

Respecto a los machos que no recibieron tratamiento, el deterioro neurológico, la pérdida de peso y de fuerza muscular se ralentizaron cuando recibieron el fármaco.

Las hembras SOD1-G93A en cambio, no fueron beneficiadas por el tratamiento. Mantuvieron valores similares en las pruebas aplicadas, tanto si habían sido inyectadas con VP1.15 como si no. Asimismo no vieron modificada su supervivencia.

La división de los animales en grupos por sexo ha permitido verificar que ambos se comportan de forma diferente frente al tratamiento. De hecho, los resultados del estudio fortalecen la idea de que los ensayos preclínicos en ELA no deben realizarse contando con animales de un solo sexo (en general como la literatura demuestra, solo con machos), o con una muestra mixta. Asimismo, creemos necesario trabajar con animales independientemente de su origen dentro de la camada: si el número de ellos es alto, podríamos considerar que se trata de una muestra representativa de lo que en la población humana correspondería a la ELA esporádica, que es la más generalizada. Dado que el modelo SOD1 G93A utilizado se trata de una cepa no congénica, el utilizar un número equilibrado de ratones hermanos de camada, garantizaría un fondo genético más homogéneo. En ese sentido, consideramos que el ensayo intenta reproducir ambas presentaciones de la ELA humana, tanto familiar como esporádica.

Hasta el momento, el Riluzol es el único fármaco aprobado para el tratamiento de la ELA, por eso es importante comparar cualquier terapia estudiada con él.

En el LAGENBIO (Laboratorio de Genética bioquímica) dirigido por la Dra. Osta en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, se llevó a cabo un estudio con ratones SOD1-G93A para analizar la supervivencia de los mismos ante el Riluzol. Como los animales utilizados en nuestro experimento fueron cedidos generosamente por su grupo, y aun cuando el diseño de su ensayo no es igual al aplicado en el nuestro, sus resultados permiten visualizar a VP1.15 como un fármaco útil en el tratamiento sintomático de la ELA.

En este sentido, la experiencia ganada a través de este trabajo, nos permite sostener que todo ensayo preclínico nuevo en ELA debiera necesariamente ser acompañado en paralelo con otro aplicando Riluzol. De esta forma se evitarían algunos saltos fáciles de fármacos hipotéticamente terapéuticos desde la experimentación animal a la clínica humana.

6. 2 - Alteraciones histológicas en médula y músculo de los animales estudiados

Como se ha visto en el punto anterior y se tratará más adelante, VP1.15 es un fármaco sintomático. No logra detener la enfermedad, pero si modificar su curso de evolución.

Debido a esto y a que los animales se sacrificaron en el estadio final de la enfermedad, no se encontraron más hallazgos histológicos que los esperables en la patología: disminución del número y atrofia de neuronas motoras en el asta anterior de la médula, astrogliosis indicativa de neuroinflamación en médula y atrofia muscular con presencia de abundante tejido cicatrizal.

El diseño del ensayo no permitía realizar otro tipo de evaluaciones porque fundamentalmente su objetivo era considerar su efecto sobre la supervivencia de los animales tratados. Por lo tanto, un estudio exhaustivo de VP1.15 sobre la arquitectura tisular debería modificar el esquema del ensayo. Los ratones deberían sacrificarse en distintos momentos de la evolución de la enfermedad, probablemente antes de la administración de VP1.15, inmediatamente después, y antes de que estos alcancen un grado de deterioro compatible con EN=3.

6.3 - Rutas de señalización moduladas por GSK-3. PDE-7. Nivel de AMPc

Las observaciones clínicas encontradas no han tenido correlación con los hallazgos a nivel molecular. No se encontraron diferencias significativas entre sexos y tratamientos (con o sin VP1.15), tal vez debido a que las vías de señalización estudiadas no son las afectadas en la patología.

No obstante se encontraron algunos datos interesantes, que podrían orientar nuevas investigaciones en el futuro. Las concentraciones de AMPc en encéfalo y en médula parecieran diferir entre machos y hembras normales (siendo la concentración de AMPc de las hembras más alta que la de los machos). Los valores de las hembras transgénicas (tanto tratadas como no tratadas con VP1.15) tienden a ser más bajos que lo encontrado normal para su sexo.

En un artículo reciente, se encontró que los niveles de AMPc en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con ELA y EP no son significativas respecto a los valores encontrados en individuos control, mientras que en la enfermedad de Creutzfeldt - Jakob (CJD) son significativamente más bajos. Estos resultados coincidirían con lo encontrado en la médula espinal de los ratones incluidos en el ensayo **(136)**.

Asimismo, la dispersión de los valores de AMPc encontrados en las hembras podría explicarse en las fluctuaciones introducidas por el ciclo gonadal **(137,138)**. Las desviaciones observadas en los valores de β -catenina también podrían explicarse de la misma manera **(139)**.

Respecto a esta proteína, nuestros resultados en encéfalo advierten que tanto hembras como machos normales tienen una expresión semejante. La tendencia en las hembras transgénicas (tanto tratadas como no tratadas) es que su expresión disminuya, mientras en los machos tratados se incrementa acercándola a los valores normales de su sexo. Paradójicamente, la expresión de β -catenina en la médula no

sigue lo observado en el encéfalo. En este caso, el único valor que se aparta de los demás, es el de los machos normales donde se ve una disminución acusada de la expresión.

En cuanto a la expresión de CREB en encéfalo, su expresión también pareciera ser diferente en machos y hembras normales, pero el análisis de lo que ocurre en los animales transgénicos se complica porque no se repiten esquemas de comportamiento.

No se puede dar una explicación fiable a lo que sucede con las expresiones de β -catenina y CREB entre los géneros a menos que se hagan nuevos experimentos con mayor número de muestras.

6.4 - Eficacia inhibitoria de VP1.15

El nivel de expresión de GSK-3 β fosforilada en Ser9 (es decir, la forma inactiva de la enzima) se ve especialmente aumentado en la médula espinal de todos los ratones tratados, pero de forma particular en los machos. Este dato correlaciona con la mejoría que experimentan en sus síntomas.

En cambio la expresión de GSK-3 activa en encéfalo y médula de los animales estudiados no sigue un patrón claro. Sobresale el hecho de que el nivel de expresión de GSK-3 β en los machos no tratados está aumentado en la médula respecto a su isoforma GSK-3 α . Como en los machos administrados con VP1.15 se observa un nivel de expresión igual en ambas isoformas activas, el hecho de que en ellos esté aumentada la expresión de pSer9 GSK-3 permitiría desequilibrar las expresiones, favoreciendo la inhibición de las rutas controladas por GSK-3.

Asumiendo que las hembras debido a sus fluctuaciones estrogénicas tendrían niveles de AMPc mayores que los machos, podrían mantener los niveles de pSer9 GSK-3 vía una doble inhibición que se daría de forma natural. En cambio, en los machos esta regulación no estaría facilitada y la terapia con un inhibidor dual como VP1.15 incrementaría local o temporalmente la concentración de AMPc, llevando a una inhibición más eficiente de GSK-3.

En ese sentido, los valores de expresión de PDE-7b tanto en el encéfalo y la médula de los machos SOD1-G93A tratados demuestran estar incrementados respecto a los que no recibieron VP1.15. Esto podría indicar que la concentración de AMPc en las fases terminales de la enfermedad de estos animales sería más baja que la de los machos SOD1-G93A que no recibieron fármaco. Una explicación posible a la elevación de la expresión de PDE-7b se encontraría en un posible efecto compensatorio disparado tras la inhibición continua durante 35 días. Nuevamente, para verificar esta posible hipótesis, debería hacerse un estudio seriado de la expresión de PDE-7 a lo largo del ensayo.

6.5 - Efecto de VP1.15 sobre la neuroinflamación

Históricamente, los astrocitos se vieron sólo como células accesorias del sistema nervioso central con función de soporte para las neuronas. Sin embargo, en las dos últimas décadas, estas células revelaron funciones más importantes relacionadas con la formación de una red gliovascular en el cerebro y su

consecuencia: una arquitectura estructural que define compartimentos funcionales e influye en la actividad neural **(140,141)**.

El proceso neuroinflamatorio está mediado principalmente por los astrocitos y es un fenómeno evidente común a todas las enfermedades neurodegenerativas. En el pasado se entendió como un efecto causado por el daño neuronal y la consiguiente activación de estas células, pero ahora, comienza a verse como una respuesta fisiológica normal generada para defender el sistema nervioso central de los agentes patógenos y ayudar a la recuperación en los procesos de estrés y las lesiones. Aun así, la astrogliosis excesiva puede promover o propagar enfermedades neurodegenerativas **(142,143)**, y aunque se ha demostrado que su reactividad en sí misma no es necesariamente perjudicial para la función neuronal **(144)** la mayor parte de los investigadores piensan que la neuroinflamación desempeña un papel importante en la degeneración neuronal y, especialmente, en la ELA **(145,146)**.

Como los astrocitos muestran diferencias en cuanto al número, diferenciación y función según el género y están implicados en la neuroinflamación, las diferentes respuestas que se presentan pueden estar predeterminadas por la exposición a la testosterona perinatal **(147)**. Estas células expresan receptores a estrógenos y muestran diferencias morfológicas y funcionales en respuesta al estradiol, además de sintetizarlo en condiciones patológicas como neuroprotector local **(148)**.

Este trabajo muestra que VP1.15 disminuyó los niveles de expresión de GFAP (marcador de astrocitos), tanto en el cerebro como en la médula espinal de los ratones tratados sin distinción de género. Se demuestra entonces que la neuroinflamación es controlada mediante la administración del fármaco y que es igualmente eficaz en ambos sexos.

6.6 - Efecto de VP1.15 sobre la dinámica mitocondrial

OPA1 es una proteína mitocondrial conocida inicialmente porque su mutación es causa de Atrofia óptica dominante autosómica. Está presente en forma soluble en el espacio intermembrana o unida a la cara externa de la membrana interna mitocondrial. Juega un importante papel en la regulación de los procesos de fusión de esta organela y en la morfología de las crestas **(149,150)**.

Su silenciamiento lleva a la fragmentación de la red de mitocondrias, pero además, aun cuando en condiciones normales está vinculada a los procesos de fusión, participa en la remodelación de las crestas durante los eventos apoptóticos llevando a la fisión mitocondrial **(151–153)**.

Las neuronas afectadas en la ELA presentan mayor fisión mitocondrial. De hecho, la localización en el espacio intermembrana de la SOD1 mutada es suficiente para determinar anomalías en la red mitocondrial neuronal **(46,47)**.

En nuestro acercamiento al estudio de la dinámica mitocondrial en astrocitos y en los tejidos analizados en los ratones SOD1-G93A sometidos al estudio no obtuvimos resultados concluyentes. Según lo observado, el encéfalo y médula de las hembras transgénicas presentan menores niveles de expresión proteica de OPA1 que las normales, y en particular es mucho más evidente en las no tratadas. Pero en los machos esto no se observa y de hecho, no hay diferencias significativas entre los dos grupos.

Si bien la fisión mitocondrial está íntimamente ligada a la apoptosis, el proceso de muerte celular puede ocurrir sin su aparición. En este caso, deberían realizarse más estudios para determinar si existe o no correlación entre los niveles de expresión de OPA1, el sexo de los ratones, la apoptosis celular y la fisión mitocondrial observada en los cultivos primarios de astrocitos derivados de ratones SOD1-G93A.

6.7 - Diferencias intergenéricas en ELA

El riesgo, la progresión, la evolución y la recuperación en las enfermedades neurodegenerativas, como la Enfermedad de Parkinson (EP), la Enfermedad de Alzheimer (EA) y la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), están estrechamente relacionados con el dimorfismo sexual. La evidencia acumulada sugiere que los estrógenos actúan sobre el aprendizaje, la memoria, el humor, el desarrollo neurológico y tienen efectos neuroprotectores que actúan a nivel anti-inflamatorio y anti-apoptótico **(154,155)**. A nivel celular, el estradiol regula la apoptosis, determina las diferencias volumétricas de género, promueve el crecimiento de las neuritas y regula la disposición de las sinapsis. Además, regula c-Fos, CREB, CBP y ERK **(156)**. Su influencia, entonces, podría estar relacionada con las diferencias con que se expresan estas enfermedades entre sexos **(157)**.

El fenotipo de la ELA en pacientes hombres y mujeres es diferente. La proporción entre géneros (masculino / femenino) es cercano a 3:2, pero esta proporción varía con la edad (2,5 en menores de 40 años y 0,75 en pacientes mayores de 80 años), y mientras que la edad y el sitio de inicio están relacionados con el sexo, la supervivencia no.

La edad de inicio de la enfermedad tiende a ser tardía en las mujeres (68,4 años) respecto a los hombres (61,5 años) con predominio de aparición bulbar y distal respectivamente en todos los grupos de edad.

El fenotipo clínico también se ve modulado por el género. Por ejemplo, el Síndrome “brazos flácidos”, que se caracteriza por una duración prolongada (55 a 76,8 meses) y cuyos síntomas aparecen predominantemente en las extremidades superiores proximales, es más frecuente en los hombres (razón varón/mujer entre 1,2 y 1,5) **(158)**.

Estas observaciones, como se postula en la revisión de Elena Blasco **(159)**, sugieren que en la ELA existe implicación hormonal: Los andrógenos tendrían un efecto tóxico mientras que los estrógenos tendrían acción protectora.

Hay varias líneas de evidencia que apoyan la teoría de que el exceso de andrógenos tendría efecto negativo:

- La Atrofia Muscular espinobulbar (SBMA) , también conocida como enfermedad de Kennedy, es una enfermedad causada por una expansión de la repetición CAG en el gen del receptor de andrógenos (AR) que genera poliglutaminas en la proteína, y que se presenta solo en los hombres **(160)**. En el modelo de ratón transgénico de esta enfermedad, los machos tienen síntomas más severos que las hembras y éstos son parcialmente revertidos con la castración **(161)**. Sin embargo en un estudio reciente realizado con un modelo relacionado en el que los ratones son tratados con testosterona durante 6 meses no se observa exacerbación de la enfermedad en los machos, y por lo tanto se sugiere que los individuos con SBMA que

toman o han tomado testosterona por sus supuestas propiedades terapéuticas, tienen baja probabilidad a sufrir efectos adversos **(162)**.

- Los receptores de andrógenos son raros en el nervio oculomotor y en las neuronas sensoriales, pero abundantes en las neuronas motoras. Esto podría explicar porque no se ven afectados en la ELA.

- Finalmente, la exposición a altos niveles de testosterona durante el embarazo está vinculado a una relación 2D:4D menor (índice que relaciona la longitud de los dedos anular y medio) y el posterior desarrollo de habilidades atléticas y la aparición de ELA **(163)**.

Desde hace tiempo es conocido que la menarquia tardía y la menopausia precoz se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar ELA. Como se mencionó en la introducción, la relación hombre/mujer disminuye con la edad y esto lleva a vincular la ausencia de estrógenos con el aumento de la probabilidad en las mujeres de padecer la enfermedad **(164)**. Sin embargo, las terapias de reemplazo hormonal con estrógenos no parecen tener ningún beneficio en la supervivencia de pacientes de sexo femenino **(165)**.

Esta característica epidemiológica encontrada en los afectados humanos también se vincula a los modelos animales. Cuando se ovariectomizaron ratones hembra SOD1-G93A, tras la cirugía se aceleró significativamente la progresión de la enfermedad y el proceso se ralentizó de nuevo (pero no se detuvo) al administrar 17 β - estradiol (E2) **(166)**. Según otro estudio, el tratamiento de las hembras ovariectomizadas SOD1-G93A con 17 β -estradiol (E2) no retrasó la aparición de la enfermedad, pero redujo la velocidad de progresión de la enfermedad a nivel motor **(167)**. Por último, el tratamiento con genisteína (un fitoestrógeno), eliminó el efecto del dimorfismo sexual observado en estos ratones transgénicos donde la aparición de la enfermedad y la mortalidad son más tempranas entre los machos que entre las hembras **(168)**.

Asimismo, en el análisis estadístico realizado sobre los datos clínicos (éxitus, ALSFRS y CVF) de los pacientes tratados en la Unidad de ELA-Servicio de Neurología del Hospital 12 de Octubre, se observaron algunos datos congruentes a los obtenidos con los ratones SOD1-G93A.

Las curvas de Kaplan Meier aplicadas a ALSFRS y CVF en el grupo de pacientes jóvenes muestran una clara diferenciación entre hombres y mujeres, con una mejor evolución en ellas. Pero por el contrario, el análisis de la supervivencia en este grupo muestra que las mujeres mueren antes. Si bien los resultados no pueden ser concluyentes por el bajo número de datos recogidos, es llamativo que en algunos parámetros el sexo femenino evolucione manteniendo mejores parámetros clínicos.

Paradójicamente, en el grupo de pacientes mayores, estos análisis se invierten: las curvas de supervivencia son semejantes en hombres y mujeres, pero la evolución de los valores de ALSFRS y CVF mejoran en ellos.

6.8 - Acción diferencial de VP1.15 entre géneros: Una explicación hipotética

En las neuronas, la vía de señalización PI3K/Akt se activa por la interacción entre el estradiol, el receptor de estrógenos α (ER α) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-IR). El resultado es la formación de un complejo

entre GSK3 y β -catenina que promueve la inactivación de GSK3 (por fosforilación en Ser9) y la estabilización de β -catenina en su forma activa **(169)**. Una vez ocurrido esto, la β -catenina se retira del complejo y se trasloca al núcleo. Allí actúa como un co-regulador transcripcional (interaccionando con miembros de la familia del factor potenciador linfocitario de células T: LEF / TCF), que media la regulación transcripcional de los genes diana vinculados a la supervivencia celular. β -catenina es capaz además de unirse al ER α nuclear e iniciar la señalización mediada por este receptor y el estradiol **(170,171)**. Por lo tanto, la modulación en el sistema nervioso central (SNC) de las interacciones entre GSK3, el ER α , el estradiol y la β -catenina, es responsable de la activación de los mecanismos genéticos asociados a la supervivencia de las neuronas. De hecho, la administración crónica de estradiol y/o Tibolona (fármaco utilizado para el reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas dado que sus productos metabólicos poseen actividad estrogénica) aumentan los niveles de pSer9 GSK3 β en hipocampo y cerebelo **(172)**.

Con los resultados obtenidos en este estudio y los datos publicados mencionados anteriormente, podría argumentarse que la acción de VP1.15 en los ratones hembra SOD1-G93A no sustituye a la inhibición de GSK3 mediada por los estrógenos. Pero para comprobar esta hipótesis se deberían hacer más estudios:

- con modelos animales diferentes en donde las hembras expresen tardíamente los síntomas de ELA coincidiendo con su período senescente, o
- con el mismo modelo SOD1-G93A pero ovariectomizando a las hembras

Aun así VP1.15 podría estar emulando el efecto neuroprotector de los estrógenos y esa es la razón por la que solo es útil en los ratones macho SOD1-G93A.

Resumiendo:

Los estudios de comportamiento y análisis molecular de los tejidos de los ratones SOD1-G93A tratados con VP1.15 muestran que es un fármaco eficaz para tratar los síntomas de la ELA, especialmente en machos.

Este ensayo indica que hay diferencias básicas en el tratamiento de los síntomas de la enfermedad y que son dependientes del sexo, por eso estas diferencias deben tenerse en cuenta en la evaluación de nuevos protocolos preclínicos.

Pero además, como se desprende de la evidencia epidemiológica y clínica de los pacientes, las diferencias entre sexos se traducen en posibles diferencias de respuesta ante los tratamientos.

CONCLUSIONES

- **VP1.15** aumenta la supervivencia de los ratones machos SOD1-G93A y mejora los parámetros de evolución neurológica, peso y debilidad muscular
- **VP1.15** aumenta los niveles de expresión de pSer9 GSK-3 en médula y encéfalo, tanto en machos como en hembras SOD1-G93A. La expresión de GSK-3 no se ve alterada ni en machos ni en hembras y la expresión de PDE-7 se ve incrementada solo en machos
- **VP1.15** es eficiente disminuyendo la neuroinflamación en ambos sexos.
- La evolución clínica de los ratones SOD1-G93A es dependiente del sexo, y tiene correlación con el efecto terapéutico del fármaco. Dicha observación puede relacionarse parcialmente con lo observado en humanos

B **BIBLIOGRAFÍA**

1. Wijesekera LC, Leigh PN. Amyotrophic lateral sclerosis. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Oct 3];4:3. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2656493&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

2. Goldstein LH, Abrahams S. Changes in cognition and behaviour in amyotrophic lateral sclerosis: nature of impairment and implications for assessment. Lancet Neurol [Internet]. 2013 Apr [cited 2015 Sep 3];12(4):368–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23518330>

3. Eisen A, Kiernan M, Mitsumoto H, Swash M. Amyotrophic lateral sclerosis: a long preclinical period? J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Oct 1];85(11):1232–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24648037>

4. Renton AE, Chiò A, Traynor BJ. State of play in amyotrophic lateral sclerosis genetics. Nat Neurosci [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Sep 15];17(1):17–23. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4544832&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

5. Chiò A, Battistini S, Calvo A, Caponnetto C, Conforti FL, Corbo M, et al. Genetic counselling in ALS: facts, uncertainties and clinical suggestions. J Neurol Neurosurg Psychiatry [Internet]. 2014 May [cited 2015 Oct 1];85(5):478–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23833266>

6. Cetin H, Rath J, Füzi J, Reichardt B, Fülöp G, Koppi S, et al. Epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis and effect of riluzole on disease course. Neuroepidemiology [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Aug 21];44(1):6–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25571962>

7. Reed DM, Brody JA. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam, 1945-1972. I. Descriptive epidemiology. Am J Epidemiol [Internet]. 1975 Apr [cited 2015 Oct 1];101(4):287–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1124759>

8. Reed DM, Torres JM, Brody JA. Amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia on Guam, 1945-1972. II. Familial and genetic studies. Am J Epidemiol [Internet]. 1975 Apr [cited 2015 Oct 1];101(4):302–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1124760>

9. Logroscino G, Traynor BJ, Hardiman O, Chio' a, Couratier P, Mitchell JD, et al. Descriptive epidemiology of amyotrophic lateral sclerosis: new evidence and unsolved issues. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Oct 3];79(1):6–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18079297>

10. Cronin S, Hardiman O, Traynor BJ. Ethnic variation in the incidence of ALS: a systematic review. *Neurology* [Internet]. 2007 Mar 27;68(13):1002–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17389304>

11. Beghi E, Logroscino G, Chiò A, Hardiman O, Mitchell D, Swingler R, et al. The epidemiology of ALS and the role of population-based registries. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2006 [cited 2012 Dec 15];1762(11-12):1150–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17071060>

12. Manjaly ZR, Scott KM, Abhinav K, Wijesekera L, Ganesalingam J, Goldstein LH, et al. The sex ratio in amyotrophic lateral sclerosis: A population based study. *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Oct 3];11(5):439–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225930>

13. Chio A, Calvo A, Moglia C, Mazzini L, Mora G. Phenotypic heterogeneity of amyotrophic lateral sclerosis: a population based study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2011 Mar 14 [cited 2015 Oct 1];82(7):740–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21402743>

14. Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, Turner MR, Eisen A, Hardiman O, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* [Internet]. 2011 Mar 12 [cited 2014 Jul 11];377(9769):942–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21296405>

15. McCombe P a, Henderson RD. Effects of gender in amyotrophic lateral sclerosis. *Gend Med* [Internet]. Elsevier HS Journals, Inc.; 2010 Dec [cited 2013 Oct 3];7(6):557–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21195356>

16. Couratier P, Truong C, Khalil M, Devière F, Vallat JM. Clinical features of flail arm syndrome. *Muscle Nerve* [Internet]. 2000 Apr [cited 2015 Oct 1];23(4):646–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10716778>

17. Allen JS, Damasio H, Grabowski TJ, Bruss J, Zhang W. Sexual dimorphism and asymmetries in the gray-white composition of the human cerebrum. *Neuroimage* [Internet]. 2003 Apr [cited 2015 Oct 2];18(4):880–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12725764>

18. Takase K, Kimura F, Yagami T, Mitsushima D. Sex-specific 24-h acetylcholine release profile in the medial prefrontal cortex: simultaneous measurement of spontaneous locomotor activity in behaving rats. *Neuroscience* [Internet]. 2009 Mar 3 [cited 2015

- Oct 2];159(1):7–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19162130>
19. Cerghet M. Proliferation and Death of Oligodendrocytes and Myelin Proteins Are Differentially Regulated in Male and Female Rodents. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Feb 1 [cited 2015 Oct 2];26(5):1439–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16452667>
 20. Zhou M, Goto N, Goto J, Moriyama H, He HJ. Gender dimorphism of axons in the human lateral corticospinal tract. *Okajimas Folia Anat Jpn* [Internet]. 2000 May [cited 2015 Oct 2];77(1):21–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10860401>
 21. Yerdelen D, Koç F, Sarica Y. The effects of gender and age on motor unit number estimation in a normal population. *Acta Neurol Belg* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Oct 2];106(1):5–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16776429>
 22. Bae JS, Sawai S, Misawa S, Kanai K, Iose S, Shibuya K, et al. Effects of age on excitability properties in human motor axons. *Clin Neurophysiol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2015 Oct 2];119(10):2282–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18760964>
 23. Fuller PI, Reddrop C, Rodger J, Bellingham MC, Phillips JK. Differential expression of the NMDA NR2B receptor subunit in motoneuron populations susceptible and resistant to amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett* [Internet]. 2006 May 15 [cited 2015 Oct 2];399(1-2):157–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16490316>
 24. Smith CC, McMahon LL. Estradiol-induced increase in the magnitude of long-term potentiation is prevented by blocking NR2B-containing receptors. *J Neurosci* [Internet]. 2006 Aug 16 [cited 2015 Oct 2];26(33):8517–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16914677>
 25. Foy MR, Xu J, Xie X, Brinton RD, Thompson RF, Berger TW. 17beta-estradiol enhances NMDA receptor-mediated EPSPs and long-term potentiation. *J Neurophysiol* [Internet]. 1999 Feb [cited 2015 Oct 2];81(2):925–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10036289>
 26. Snyder MA, Cooke BM, Woolley CS. Estradiol potentiation of NR2B-dependent EPSCs is not due to changes in NR2B protein expression or phosphorylation. *Hippocampus* [Internet]. 2011 Apr [cited 2015 Oct 2];21(4):398–408. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20082293>
 27. Vedder LC, Smith CC, Flannigan AE, McMahon LL. Estradiol-induced increase in novel object recognition requires hippocampal NR2B-containing NMDA receptors. *Hippocampus* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Oct 2];23(1):108–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4038023&tool=pmcentrez>

&rendertype=abstract

28. Vagnerova K, Koerner IP, Hurn PD. Gender and the Injured Brain. *Anesth Analg* [Internet]. 2008 Jul [cited 2015 Oct 2];107(1):201–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2651745&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
29. Olsen TS, Andersen KK. Female survival advantage relates to male inferiority rather than female superiority: A hypothesis based on the impact of age and stroke severity on 1-week to 1-year case fatality in 40,155 men and women. *Gend Med* [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Oct 2];7(4):284–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20869629>
30. Cowell PE, Turetsky BI, Gur RC, Grossman RI, Shtasel DL, Gur RE. Sex differences in aging of the human frontal and temporal lobes. *J Neurosci* [Internet]. 1994 Aug [cited 2015 Oct 2];14(8):4748–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8046448>
31. Ingre C, Roos PM, Piehl F, Kamel F, Fang F. Risk factors for amyotrophic lateral sclerosis. *Clin Epidemiol* [Internet]. 2015 Jan [cited 2015 Feb 27];7:181–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4334292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Redler RL, Dokholyan N V. The complex molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Prog Mol Biol Transl Sci* [Internet]. 2012 Jan [cited 2015 Jun 3];107:215–62. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3605887&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Peters OM, Ghasemi M, Brown RH. Emerging mechanisms of molecular pathology in ALS. *J Clin Invest* [Internet]. 2015 May [cited 2015 Jul 21];125(5):1767–79. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25932674>
34. Al-Chalabi A, Jones A, Troakes C, King A, Al-Sarraj S, van den Berg LH. The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Aug 25];124(3):339–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22903397>
35. Chen S, Sayana P, Zhang X, Le W. Genetics of amyotrophic lateral sclerosis: an update. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Jul 31];8:28. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3766231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Bunton-Stasyshyn RKA, Saccon RA, Fratta P, Fisher EMC. SOD1 Function and Its Implications for Amyotrophic Lateral Sclerosis Pathology: New and Renascent Themes.

- Neuroscientist [Internet]. 2015 Oct [cited 2015 Oct 2];21(5):519–29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25492944>
37. Turner BJ, Talbot K. Transgenics, toxicity and therapeutics in rodent models of mutant SOD1-mediated familial ALS. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2008 May [cited 2015 Oct 2];85(1):94–134. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18282652>
 38. Nishitoh H, Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Yokota T, Fukutomi H, et al. ALS-linked mutant SOD1 induces ER stress- and ASK1-dependent motor neuron death by targeting Derlin-1. *Genes Dev* [Internet]. 2008 Jun 1 [cited 2015 Jul 20];22(11):1451–64. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2418582&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 39. Polymenidou M, Cleveland DW. Prion-like spread of protein aggregates in neurodegeneration. *J Exp Med* [Internet]. 2012 May 7 [cited 2015 Oct 2];209(5):889–93. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3348110&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 40. Su B, Wang X, Zheng L, Perry G, Smith MA, Zhu X. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Oct 2];1802(1):135–42. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2790543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 41. Karbowski M, Neutzner A. Neurodegeneration as a consequence of failed mitochondrial maintenance. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2011 Dec 7 [cited 2015 Oct 2];123(2):157–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22143516>
 42. Kawamata H, Manfredi G. Mitochondrial dysfunction and intracellular calcium dysregulation in ALS. *Mech Ageing Dev* [Internet]. Jan [cited 2015 Sep 9];131(7-8):517–26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933290&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 43. Shi P, Wei Y, Zhang J, Gal J, Zhu H. Mitochondrial dysfunction is a converging point of multiple pathological pathways in amyotrophic lateral sclerosis. *J Alzheimers Dis* [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Oct 2];20 Suppl 2:S311–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20463400>
 44. Cozzolino M, Carri MT. Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2012 May [cited 2015 Oct 2];97(2):54–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21827820>

45. Martin LJ. Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. Pharmaceuticals (Basel) [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Oct 2];3(4):839–915. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3023298&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

46. Magrané J, Manfredi G. Mitochondrial function, morphology, and axonal transport in amyotrophic lateral sclerosis. Antioxid Redox Signal [Internet]. 2009 Jul [cited 2015 Oct 2];11(7):1615–26. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2789440&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

47. Magrane J, Hervias I, Henning MS, Damiano M, Kawamata H, Manfredi G. Mutant SOD1 in neuronal mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities. Hum Mol Genet [Internet]. 2009 Sep 24 [cited 2015 Oct 2];18(23):4552–64. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773270&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

48. Chaturvedi RK, Beal MF. Mitochondrial approaches for neuroprotection. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2008 Dec [cited 2015 Sep 17];1147:395–412. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2605644&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

49. Wang W, Li L, Lin W-L, Dickson DW, Petrucelli L, Zhang T, et al. The ALS disease-associated mutant TDP-43 impairs mitochondrial dynamics and function in motor neurons. Hum Mol Genet [Internet]. 2013 Dec 1 [cited 2015 Aug 23];22(23):4706–19. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3820133&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

50. Barrett EF, Barrett JN, David G. Mitochondria in motor nerve terminals: function in health and in mutant superoxide dismutase 1 mouse models of familial ALS. J Bioenerg Biomembr [Internet]. 2011 Dec [cited 2015 Oct 2];43(6):581–6. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3237816&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

51. Lautenschläger J, Prell T, Ruhmer J, Weidemann L, Witte OW, Grosskreutz J. Overexpression of human mutated G93A SOD1 changes dynamics of the ER mitochondria calcium cycle specifically in mouse embryonic motor neurons. Exp Neurol [Internet]. 2013 Sep [cited 2015 Oct 2];247:91–100. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578819>

52. Keeney PM, Bennett JP. ALS spinal neurons show varied and reduced mtDNA gene copy numbers and increased mtDNA gene deletions. Mol Neurodegener [Internet]. 2010 Jan [cited 2015 Oct 2];5:21. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2889994&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
53. Wiedemann FR, Manfredi G, Mawrin C, Beal MF, Schon EA. Mitochondrial DNA and respiratory chain function in spinal cords of ALS patients. *J Neurochem* [Internet]. 2002 Feb [cited 2015 Oct 2];80(4):616–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11841569>
 54. Echaniz-Laguna A, Zoll J, Ribera F, Tranchant C, Warter J-M, Lonsdorfer J, et al. Mitochondrial respiratory chain function in skeletal muscle of ALS patients. *Ann Neurol* [Internet]. 2002 Nov 24 [cited 2015 Oct 2];52(5):623–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12402260>
 55. Jiang Z, Wang W, Perry G, Zhu X, Wang X. Mitochondrial dynamic abnormalities in amyotrophic lateral sclerosis. *Transl Neurodegener* [Internet]. 2015 Jul 29 [cited 2015 Oct 2];4(1):14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4518588&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 56. Wallis N, Zagami CJ, Beart PM, O'Shea RD. Combined excitotoxic–oxidative stress and the concept of non-cell autonomous pathology of ALS: Insights into motoneuron axonopathy and astrogliosis. *Neurochem Int* [Internet]. 2012 Sep [cited 2015 Oct 2];61(4):523–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22421531>
 57. Murdock BJ, Bender DE, Segal BM, Feldman EL. The dual roles of immunity in ALS: injury overrides protection. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2015 May [cited 2015 Sep 29];77:1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25726748>
 58. Hooten KG, Beers DR, Zhao W, Appel SH. Protective and Toxic Neuroinflammation in Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2015 Apr [cited 2015 Oct 2];12(2):364–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25567201>
 59. Vargas MR, Johnson JA. Astrogliosis in amyotrophic lateral sclerosis: role and therapeutic potential of astrocytes. *Neurotherapeutics* [Internet]. 2010 Oct [cited 2013 Oct 3];7(4):471–81. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2967019&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 60. Koh S-H, Baek W, Kim SH. Brief review of the role of glycogen synthase kinase-3 β in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurol Res Int* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 3];2011:205761. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3096311&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

61. Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci [Internet]. 2004 Feb [cited 2013 Oct 3];29(2):95–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102436>
62. Kim YT, Hur E-M, Snider WD, Zhou F-Q. Role of GSK3 Signaling in Neuronal Morphogenesis. Front Mol Neurosci [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Aug 18];4:48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3222852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
63. Jope RS, Johnson GVW. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. Trends Biochem Sci [Internet]. 2004 Feb [cited 2013 Sep 18];29(2):95–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102436>
64. Smillie KJ, Cousin MA. The Role of GSK3 in Presynaptic Function. Int J Alzheimers Dis [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 3];2011:263673. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3087464&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Chiu C-T, Chuang D-M. Molecular actions and therapeutic potential of lithium in preclinical and clinical studies of CNS disorders. Pharmacol Ther [Internet]. 2010 Nov [cited 2015 Oct 3];128(2):281–304. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3167234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
66. Fornai F, Siciliano G, Manca ML, Murri L, Paparelli A, Ruggieri S. Lithium in ALS: from the bench to the bedside. Amyotroph Lateral Scler [Internet]. 2008 Apr [cited 2015 Oct 3];9(2):123–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18428006>
67. Feng H-L, Leng Y, Ma C-H, Zhang J, Ren M, Chuang D-M. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. Neuroscience [Internet]. 2008 Aug 26 [cited 2013 Oct 3];155(3):567–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2709275&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsichenko O, Ferrucci M, Manca ML, et al. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2008 Feb 12 [cited 2014 Feb 10];105(6):2052–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2538879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
69. Gill A, Kidd J, Vieira F, Thompson K, Perrin S. No benefit from chronic lithium dosing in a sibling-matched, gender balanced, investigator-blinded trial using a standard mouse model of familial ALS. PLoS One [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Jan 3];4(8):e6489.

Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2714460&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

70. Pizzasegola C, Caron I, Daleno C, Ronchi A, Minoia C, Carri MT, et al. Treatment with lithium carbonate does not improve disease progression in two different strains of SOD1 mutant mice. *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2009 Aug [cited 2014 Feb 10];10(4):221–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308767>

71. Aggarwal SP, Zinman L, Simpson E, McKinley J, Jackson KE, Pinto H, et al. Safety and efficacy of lithium in combination with riluzole for treatment of amyotrophic lateral sclerosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* [Internet]. 2010 May [cited 2014 Feb 10];9(5):481–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3071495&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

72. Mitsumoto H, Brooks BR, Silani V. Clinical trials in amyotrophic lateral sclerosis: why so many negative trials and how can trials be improved? *Lancet Neurol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2015 Oct 3];13(11):1127–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25316019>

73. Agam G, Israelson A. Why lithium studies for ALS treatment should not be halted prematurely. *Front Neurosci* [Internet]. 2014 Sep 2 [cited 2015 Oct 3];8:267. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4151332&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

74. Sassone-Corsi P. The cyclic AMP pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biol* [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Aug 21];4(12). Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3504441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

75. Omori K, Kotera J. Overview of PDEs and their regulation. *Circ Res* [Internet]. 2007 Feb 16 [cited 2012 Nov 16];100(3):309–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307970>

76. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2006 Mar [cited 2015 Oct 3];109(3):366–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16102838>

77. Johansson EM, Reyes-Irisarri E, Mengod G. Comparison of cAMP-specific phosphodiesterase mRNAs distribution in mouse and rat brain. *Neurosci Lett* [Internet]. 2012 Sep 6 [cited 2015 Oct 3];525(1):1–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22884617>

78. Bloom TJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes expressed in mouse skeletal muscle. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2002 Dec [cited 2013 Oct 3];80(12):1132–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12564638>

79. Mika D, Leroy J, Vandecasteele G, Fischmeister R. PDEs create local domains of cAMP signaling. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2012 Feb [cited 2015 Oct 3];52(2):323–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21888909>

80. Keravis T, Luginier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2015 Oct 3];165(5):1288–305. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3372715&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

81. Calebiro D, Maiellaro I. cAMP signaling microdomains and their observation by optical methods. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Oct 3];8:350. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4211404&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

82. Conti M, Mika D, Richter W. Perspectives on: Cyclic nucleotide microdomains and signaling specificity: Cyclic AMP compartments and signaling specificity: Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Gen Physiol* [Internet]. 2013 Dec 30 [cited 2015 Oct 3];143(1):29–38. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

83. Pan CQ, Sudol M, Sheetz M, Low BC. Modularity and functional plasticity of scaffold proteins as p(l)acemakers in cell signaling. *Cell Signal* [Internet]. 2012 Nov [cited 2015 Oct 3];24(11):2143–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22743133>

84. Maurice DH, Wilson LS, Rampersad SN, Hubert F, Truong T, Kaczmarek M, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs): coincidence detectors acting to spatially and temporally integrate cyclic nucleotide and non-cyclic nucleotide signals: Figure 1. *Biochem Soc Trans* [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2015 Oct 3];42(2):250–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24646226>

85. Boswell-Smith V, Spina D, Page CP. Phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol* [Internet]. 2006 Jan [cited 2012 Nov 4];147 Suppl :S252–7. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1760738&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

86. Menniti FS, Faraci WS, Schmidt CJ. Phosphodiesterases in the CNS: targets for drug development. *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2006 Aug [cited 2012 Nov 25];5(8):660–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16883304>

87. Sasaki T, Kotera J, Yuasa K, Omori K. Identification of human PDE7B, a cAMP-specific phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2000 May 19 [cited 2013 Oct 3];271(3):575–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10814504>

88. Averaimo S, Nicol X. Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2014 Jan [cited 2015 Oct 3];8:376. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4230202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

89. Song W, Jin XA. Cyclic AMP inhibits neuromuscular junction maturation mediated by intracellular Ca²⁺. *Neurosci Lett* [Internet]. 2015 Mar 4 [cited 2015 Oct 3];589:104–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25596442>

90. Sakamoto K, Karelina K, Obrietan K. CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 3];116(1):1–9. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3575743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

91. Lonze BE, Ginty DD. Function and regulation of CREB family transcription factors in the nervous system. *Neuron* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2013 Oct 3];35(4):605–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194863>

92. Benito E, Barco A. CREB's control of intrinsic and synaptic plasticity: implications for CREB-dependent memory models. *Trends Neurosci* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010 May [cited 2012 Oct 30];33(5):230–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20223527>

93. Benito E, Valor LM, Jimenez-Minchan M, Huber W, Barco A. cAMP response element-binding protein is a primary hub of activity-driven neuronal gene expression. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Dec 14 [cited 2013 Oct 3];31(50):18237–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22171029>

94. Mayr B, Montminy M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2001 Aug [cited 2013 Oct 3];2(8):599–609. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11483993>

95. Grimes CA, Jope RS. CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium. *J Neurochem* [Internet]. 2001 Sep [cited 2013 Oct 3];78(3):1041–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11511111>

- 3];78(6):1219–32. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1947002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
96. Valor LM, Jancic D, Lujan R, Barco a. Ultrastructural and transcriptional profiling of neuropathological misregulation of CREB function. *Cell Death Differ* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Oct [cited 2013 Oct 3];17(10):1636–44. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20395962>
97. Grimes CA, Jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol* [Internet]. 2001 Nov [cited 2013 Oct 3];65(4):391–426. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11527574>
98. Casu MA, Sanna A, Spada GP, Falzoi M, Mongeau R, Pani L. Effects of acute and chronic valproate treatments on p-CREB levels in the rat amygdala and nucleus accumbens. *Brain Res* [Internet]. 2007 Apr 13 [cited 2015 Oct 3];1141:15–24. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17270156>
99. Rouaux C. Critical loss of CBP/p300 histone acetylase activity by caspase-6 during neurodegeneration. *EMBO J* [Internet]. 2003 Dec 15 [cited 2015 Oct 3];22(24):6537–49. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=291810&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
100. Rouaux C, Panteleeva I, René F, Gonzalez de Aguilar J-L, Echaniz-Laguna A, Dupuis L, et al. Sodium valproate exerts neuroprotective effects in vivo through CREB-binding protein-dependent mechanisms but does not improve survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *J Neurosci* [Internet]. 2007 May 23 [cited 2013 Oct 3];27(21):5535–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17522299>
101. Chung YH, Joo KM, Lee YJ, Kim MJ, Cha CI. Reactive astrocytes express cAMP-response-element-binding protein (CREB) binding protein (CBP) in the central nervous system of transgenic mice expressing a human Cu/Zn superoxide dismutase mutation. *Neurosci Lett* [Internet]. 2003 Jun 12 [cited 2013 Oct 3];343(3):159–62. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770687>
102. Teo J-L, Kahn M. The Wnt signaling pathway in cellular proliferation and differentiation: A tale of two coactivators. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Sep 30 [cited 2013 Oct 3];62(12):1149–55. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20920541>
103. Wisniewska MB. Physiological Role of β -Catenin/TCF Signaling in Neurons of the Adult Brain. *Neurochem Res* [Internet]. 2013 Feb 2 [cited 2015 Oct 3];38(6):1144–55. Available from:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3653035&tool=pmcentrez>

&rendertype=abstract

104. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat Rev Drug Discov* [Internet]. 2014 Jul 1 [cited 2014 Jul 10];13(7):513–32. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4426976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

105. L'episcopo F, Serapide MF, Tirollo C, Testa N, Caniglia S, Morale MC, et al. A Wnt1 regulated Frizzled-1/ β -Catenin signaling pathway as a candidate regulatory circuit controlling mesencephalic dopaminergic neuron-astrocyte crosstalk: Therapeutical relevance for neuron survival and neuroprotection. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2011 Jan [cited 2015 Oct 3];6:49. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3162575&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

106. Mills F, Bartlett TE, Dissing-Olesen L, Wisniewska MB, Kuznicki J, Macvicar BA, et al. Cognitive flexibility and long-term depression (LTD) are impaired following β -catenin stabilization in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Jun 10 [cited 2015 Sep 22];111(23):8631–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4060709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

107. Godin JD, Poizat G, Hickey MA, Maschat F, Humbert S. Mutant huntingtin-impaired degradation of beta-catenin causes neurotoxicity in Huntington's disease. *EMBO J* [Internet]. 2010 Jul 21 [cited 2013 Oct 3];29(14):2433–45. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2910267&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

108. Flentke GR, Garic A, Hernandez M, Smith SM. CaMKII represses transcriptionally active β -catenin to mediate acute ethanol neurodegeneration and can phosphorylate β -catenin. *J Neurochem* [Internet]. 2014 Feb 24 [cited 2015 Oct 3];128(4):523–35. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3946158&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

109. Pinto C, Cárdenas P, Osses N, Henríquez JP. Characterization of Wnt/ β -catenin and BMP/Smad signaling pathways in an in vitro model of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Oct 3];7:239. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3847560&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

110. Chen Y, Guan Y, Liu H, Wu X, Yu L, Wang S, et al. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway is associated with glial proliferation in the adult spinal cord of ALS transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2012 Apr 6 [cited 2012 Dec 1];420(2):397–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22426476>

111. Yang W, Leystra-Lantz C, Strong MJ. Upregulation of GSK3beta expression in frontal and temporal cortex in ALS with cognitive impairment (ALSci). *Brain Res* [Internet]. 2008 Feb 27 [cited 2013 Oct 3];1196:131–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221734>

112. Morales-Garcia JA, Palomo V, Redondo M, Alonso-Gil S, Gil C, Martinez A, et al. Crosstalk between Phosphodiesterase 7 and Glycogen Synthase Kinase-3: Two Relevant Therapeutic Targets for Neurological Disorders. *ACS Chem Neurosci* [Internet]. 2014 Jan 17 [cited 2014 Mar 18]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24437940>

113. Pérez DI, Pistolozzi M, Palomo V, Redondo M, Fortugno C, Gil C, et al. 5-Imino-1,2,4-thiadiazoles and quinazolines derivatives as glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) and phosphodiesterase 7 (PDE7) inhibitors: determination of blood-brain barrier penetration and binding to human serum albumin. *Eur J Pharm Sci* [Internet]. 2012 Apr 11 [cited 2013 Oct 3];45(5):677–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22306656>

114. Lipina T V, Palomo V, Gil C, Martinez A, Roder JC. Dual inhibitor of PDE7 and GSK-3-VP1.15 acts as antipsychotic and cognitive enhancer in C57BL/6J mice. *Neuropharmacology* [Internet]. 2013 Jan [cited 2014 Feb 16];64:205–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22749842>

115. Susín C, Morales-Garcia JA, Aguilar-Morante D, Palomo V, Sanz-Sancristobal M, Alonso-Gil S, et al. The new iminothiadiazole derivative VP1.14 ameliorates hippocampal damage after an excitotoxic injury. *J Neurochem* [Internet]. 2012 Sep [cited 2014 Feb 4];122(6):1193–202. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22774807>

116. Perez-Gonzalez R, Pascual C, Antequera D, Bolos M, Redondo M, Perez DI, et al. Phosphodiesterase 7 inhibitor reduced cognitive impairment and pathological hallmarks in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2013 Sep [cited 2013 Oct 3];34(9):2133–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23582662>

117. Li M, Wang X, Meintzer MK, Laessig T, Birnbaum MJ, Heidenreich KA. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* [Internet]. 2000 Dec [cited 2015 Oct 3];20(24):9356–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=102192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

118. Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science*. 1994 Jun 17;264(5166):1772–5.

119. Gurney ME. Transgenic-Mouse Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *N Engl J Med*

- [Internet]. 1994 Dec 22 [cited 2015 Oct 3];331(25):1721–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7832899>
120. Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, et al. Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part I, background and methods. *Brain Behav* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Aug 20];3(4):335–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3869677&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 121. Vinsant S, Mansfield C, Jimenez-Moreno R, Del Gaizo Moore V, Yoshikawa M, Hampton TG, et al. Characterization of early pathogenesis in the SOD1(G93A) mouse model of ALS: part II, results and discussion. *Brain Behav* [Internet]. 2013 Jul [cited 2015 Aug 20];3(4):431–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3869683&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 122. Alves CJ, de Santana LP, dos Santos AJD, de Oliveira GP, Duobles T, Scorisa JM, et al. Early motor and electrophysiological changes in transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis and gender differences on clinical outcome. *Brain Res* [Internet]. 2011 Jun 7 [cited 2015 Aug 27];1394:90–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21354109>
 123. Knippenberg S, Thau N, Dengler R, Petri S. Significance of behavioural tests in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Behav Brain Res* [Internet]. 2010 Nov 12 [cited 2015 Oct 3];213(1):82–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20450936>
 124. Blauw HM, Barnes CP, van Vught PWJ, van Rheenen W, Verheul M, Cuppen E, et al. SMN1 gene duplications are associated with sporadic ALS. *Neurology*. 2012 Mar 13;78(11):776–80.
 125. Bame M, Pentiak PA, Needleman R, Brusilow WSA. Effect of sex on lifespan, disease progression, and the response to methionine sulfoximine in the SOD1 G93A mouse model for ALS. *Gend Med* [Internet]. 2012 Dec [cited 2015 Oct 3];9(6):524–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23217569>
 126. Ludolph AC, Bendotti C, Blaugrund E, Chio A, Greensmith L, Loeffler J-P, et al. Guidelines for preclinical animal research in ALS/MND: A consensus meeting. *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2010 Jan [cited 2013 Oct 3];11(1-2):38–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20184514>
 127. Scott S, Kranz JE, Cole J, Lincecum JM, Thompson K, Kelly N, et al. Design, power, and interpretation of studies in the standard murine model of ALS. *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Oct 3];9(1):4–15. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18273714>

128. Koh S-H, Kim Y, Kim HY, Hwang S, Lee CH, Kim SH. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 suppresses the onset of symptoms and disease progression of G93A-SOD1 mouse model of ALS. *Exp Neurol* [Internet]. 2007 Jun [cited 2013 Oct 3];205(2):336–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17433298>
129. Benatar M. Lost in translation: treatment trials in the SOD1 mouse and in human ALS. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2007 Apr [cited 2012 Nov 1];26(1):1–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17300945>
130. Qiu J, Cai D, Dai H, McAtee M, Hoffman PN, Bregman BS, et al. Spinal axon regeneration induced by elevation of cyclic AMP. *Neuron* [Internet]. 2002 Jun 13 [cited 2013 Oct 3];34(6):895–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086638>
131. Cai D, Deng K, Mellado W, Lee J, Ratan RR, Filbin MT. Arginase I and polyamines act downstream from cyclic AMP in overcoming inhibition of axonal growth MAG and myelin in vitro. *Neuron* [Internet]. 2002 Aug 15 [cited 2013 Oct 3];35(4):711–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12194870>
132. Nikulina E, Tidwell JL, Dai HN, Bregman BS, Filbin MT. The phosphodiesterase inhibitor rolipram delivered after a spinal cord lesion promotes axonal regeneration and functional recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Jun 8 [cited 2013 Oct 3];101(23):8786–90. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=423273&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
133. Pearse DD, Pereira FC, Marcillo AE, Bates ML, Berrocal YA, Filbin MT, et al. cAMP and Schwann cells promote axonal growth and functional recovery after spinal cord injury. *Nat Med* [Internet]. 2004 Jun [cited 2013 Oct 3];10(6):610–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15156204>
134. Bullock BP, Habener JF. Phosphorylation of the cAMP response element binding protein CREB by cAMP-dependent protein kinase A and glycogen synthase kinase-3 alters DNA-binding affinity, conformation, and increases net charge. *Biochemistry* [Internet]. 1998 Mar 17 [cited 2015 Oct 3];37(11):3795–809. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9521699>
135. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, Browning D, Dulin NO. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Apr 14 [cited 2012 Nov 24];281(15):9971–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476742>
136. Oeckl P, Steinacker P, Lehnert S, Jesse S, Kretzschmar H a, Ludolph AC, et al. CSF

- concentrations of cAMP and cGMP are lower in patients with Creutzfeldt-Jakob disease but not Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis. PLoS One [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Oct 3];7(3):e32664. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3292568&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
137. Zubin P, Taleisnik S. Hypothalamic cyclic-AMP throughout the 4-day estrous cycle of the female rat. Brain Res [Internet]. 1983 Jul 25 [cited 2013 Oct 3];271(2):273–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6311328>
 138. Wang Z, Shi F, Jiang Y-Q, Lu L, Wang H, Watanabe G, et al. Changes of cyclic AMP levels and phosphodiesterase activities in the rat ovary. J Reprod Dev [Internet]. 2007 Aug [cited 2013 Oct 3];53(4):717–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380041>
 139. Barrera-Ocampo A, Gutierrez-Vargas J, Garcia-Segura LM, Cardona-Gómez GP. Glycogen synthase kinase-3 β / β -catenin signaling in the rat hypothalamus during the estrous cycle. J Neurosci Res [Internet]. 2012 May [cited 2013 Oct 3];90(5):1078–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22331547>
 140. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. Trends Neurosci [Internet]. 2003 Oct [cited 2013 Oct 3];26(10):523–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14522144>
 141. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron [Internet]. 2008 Nov 6 [cited 2013 Oct 3];60(3):430–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995817>
 142. Skaper SD. The brain as a target for inflammatory processes and neuroprotective strategies. Ann N Y Acad Sci [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 Oct 3];1122:23–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18077562>
 143. Czőłnkowska A, Kurkowska-Jastrzębska I. Inflammation and gliosis in neurological diseases--clinical implications. J Neuroimmunol [Internet]. 2011 Feb [cited 2013 Oct 3];231(1-2):78–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943275>
 144. Vázquez-Chona FR, Swan A, Ferrell WD, Jiang L, Baehr W, Chien W-M, et al. Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. BMC Neurosci [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Oct 3];12:98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3203081&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 145. Phani S, Re DB, Przedborski S. The Role of the Innate Immune System in ALS. Front Pharmacol [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Oct 3];3:150. Available from:

- <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3418523&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
146. Blackburn D, Sargsyan S, Monk PN, Shaw PJ. Astrocyte function and role in motor neuron disease: a future therapeutic target? *Glia* [Internet]. 2009 Sep [cited 2013 Oct 3];57(12):1251–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19373940>
 147. Arevalo MA, Santos-Galindo M, Lagunas N, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. Selective estrogen receptor modulators as brain therapeutic agents. *J Mol Endocrinol* [Internet]. 2011 Feb [cited 2012 Dec 13];46(1):R1–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21071476>
 148. Azcoitia I, Santos-Galindo M, Arevalo MA, Garcia-Segura LM. Role of astroglia in the neuroplastic and neuroprotective actions of estradiol. *Eur J Neurosci* [Internet]. 2010 Dec [cited 2015 Oct 3];32(12):1995–2002. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21143654>
 149. Kuznetsov A V., Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R. The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2015 Oct 3];41(10):1928–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19703655>
 150. Zorzano A, Liesa M, Sebastián D, Segalés J, Palacín M. Mitochondrial fusion proteins: Dual regulators of morphology and metabolism. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2010 Aug [cited 2015 Oct 3];21(6):566–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20079867>
 151. Yamaguchi R, Perkins G. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochim Biophys Acta* [Internet]. 2009 Aug [cited 2015 Oct 3];1787(8):963–72. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2773558&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 152. Cho D-H, Nakamura T, Lipton SA. Mitochondrial dynamics in cell death and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2010 Oct [cited 2015 Sep 11];67(20):3435–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20577776>
 153. Perkins G, Bossy-Wetzel E, Ellisman MH. New insights into mitochondrial structure during cell death. *Exp Neurol* [Internet]. 2009 Aug [cited 2015 Oct 3];218(2):183–92. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2712651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 154. Czlonkowska A, Ciesielska A, Gromadzka G, Kurkowska-Jastrzebska I. Estrogen and cytokines production - the possible cause of gender differences in neurological

- diseases. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Oct 3];11(8):1017–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777251>
155. Spence RD, Voskuhl RR. Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front Neuroendocrinol* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Oct 3];33(1):105–15. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3616506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
156. McCARTHY MM. Estradiol and the Developing Brain. *Physiol Rev* [Internet]. 2008 Jan 1 [cited 2015 Oct 3];88(1):91–134. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2754262&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
157. Gillies GE, McArthur S. Estrogen actions in the brain and the basis for differential action in men and women: a case for sex-specific medicines. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2010 Jun [cited 2013 Oct 3];62(2):155–98. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2879914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
158. Al-Chalabi A, Hardiman O. The epidemiology of ALS: a conspiracy of genes, environment and time. *Nat Rev Neurol* [Internet]. 2013 Nov [cited 2015 Aug 20];9(11):617–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126629>
159. Blasco H, Guennoc A-M, Veyrat-Durebex C, Gordon PH, Andres CR, Camu W, et al. Amyotrophic lateral sclerosis: a hormonal condition? *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2012 Oct [cited 2013 Oct 3];13(6):585–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22873563>
160. La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH. Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature*. 1991 Jul 4;352(6330):77–9.
161. Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, et al. Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron* [Internet]. 2002 Aug 29 [cited 2013 Oct 3];35(5):843–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12372280>
162. Chevalier-Larsen ES, Merry DE. Testosterone treatment fails to accelerate disease in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Dis Model Mech* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Oct 3];5(1):141–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3255552&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

163. Wicks P. Hypothesis: higher prenatal testosterone predisposes ALS patients to improved athletic performance and manual professions. *Amyotroph Lateral Scler* [Internet]. 2012 May [cited 2013 Oct 3];13(3):251–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22185395>
164. Chió A, Meineri P, Tribolo A, Schiffer D. Risk factors in motor neuron disease: a case-control study. *Neuroepidemiology* [Internet]. 1991 Jan [cited 2013 Oct 3];10(4):174–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1745327>
165. Rudnicki SA. Estrogen replacement therapy in women with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* [Internet]. 1999 Oct 31 [cited 2013 Oct 3];169(1-2):126–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10540020>
166. Groeneveld GJ, Van Muiswinkel FL, Sturkenboom JM, Wokke JHJ, Bär PR, Van den Berg LH. Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate disease progression of a mouse model of ALS. *Brain Res* [Internet]. 2004 Sep 17 [cited 2013 Oct 3];1021(1):128–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15328040>
167. Choi C-I, Lee Y-D, Gwag BJ, Cho SI, Kim S-S, Suh-Kim H. Effects of estrogen on lifespan and motor functions in female hSOD1 G93A transgenic mice. *J Neurol Sci* [Internet]. 2008 May 15 [cited 2013 Oct 3];268(1-2):40–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18054961>
168. Trieu VN, Uckun FM. Genistein is neuroprotective in murine models of familial amyotrophic lateral sclerosis and stroke. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 May 19 [cited 2013 Oct 3];258(3):685–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10329446>
169. Cardona-Gomez P, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2004 Mar [cited 2013 Oct 3];25(3):363–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15033165>
170. Garcia-Segura LM, Sanz A, Mendez P. Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology* [Internet]. 2006 Jan [cited 2013 Oct 3];84(4):275–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17124377>
171. Varea O, Arevalo M-A, Garrido JJ, Garcia-Segura LM, Wandosell F, Mendez P. Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids* [Internet]. Jan [cited 2013 Oct 3];75(8-9):565–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19778547>
172. Pinto-Almazán R, Calzada-Mendoza CC, Campos-Lara MG, Guerra-Araiza C. Effect of chronic administration of estradiol, progesterone, and tibolone on the expression and

phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β and the microtubule-associated protein tau in the hippocampus and cerebellum of female rat. J Neurosci Res [Internet]. 2012 Apr 20 [cited 2015 Oct 3];90(4):878–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22183707>

Tabla 5.1: Datos estadísticos del estudio de supervivencia realizado sobre el total de los ratones SOD1-G93A estudiados

	Hembras (n=30)	Machos (n=22)	Total de ratones (n=52)	Hembras T (n=15)	Machos T (n=11)	Hembras NT (n=15)	Machos NT (n=11)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,1463	3,652	0,009388	3,983	3,983	9,932	9,932
Grados de libertad	1	1	1	1	1	1	1
Valor P	0,7021	0,0560	0,9228	0,0459	0,0459	0,0016	0,0016
Significancia	NS	NS	NS	S (*)	S (*)	S (**)	S (**)
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,0004250	1,619	0,4716	3,536	3,536	8,406	8,406
Grados de libertad	1	1	1	1	1	1	1
Valor P	0,9836	0,2033	0,4923	0,0601	0,0601	0,0037	0,0037
Significancia	NS	NS	NS	NS	NS	S (**)	S (**)
Mediana de supervivencia							
No tratados	144,0	132,0	134,0	142,0	138,0	144,0	132,0
Tratados	142,0	138,0	139,0				
Ratio	1,014	0,9565	0,9640		1,029	1,091	
95% Intervalo de confianza	0,5252 -1,503	0,5318 -1,381	0,3865 -1,542	0,5697 -0,9827	0,5697 -0,9827	0,6417 -1,540	
Riesgo relativo							
Ratio	0,8646	2,753	1,029	0,3870	0,3870	0,1617	0,1617
95% Intervalo de Confianza	0,4103 -1,822	0,9743 -7,778	0,5819 -1,818	0,1524 - 1,488	0,1524 - 1,488	0,05206 -0,5021	

Tabla 5.2: Datos estadísticos del estudio de supervivencia realizado sobre los ratones SOD1-

	Hembras (n=12)	Machos (n=12)	Total de ratones (n=24)
Test Log-rank (Mantel Cox)			
Chi Cuadrado	0,6696	3,363	0,02209
Grados de libertad	1	1	1
Valor P	0,4132	0,0667	0,8819
Significancia	NS	NS	NS
			1 0,5003 NS
			1 0,0294 S(*)
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon			
Chi Cuadrado	0,3082	2,151	0,2100
Grados de libertad	1	1	1
Valor P	0,5788	0,1425	0,6468
Significancia	NS	NS	NS
			0,4051 1 0,5245 NS
			3,880 1 0,0489 S(*)
Mediana de supervivencia			
No tratados	146,5	127,0	140,5
Tratados	140,5	140,0	140,0
Ratio	1,043	0,9071	1,004
95% Intervalo de Confianza	0,7202 - 1,365	0,6020 - 1,212	0,6811 - 1,326
			146,5 127,0 1,54 0,8484 - 1,459
Riesgo relativo			
Ratio	0,5890	4,266	0,6653
95% Intervalo de Confianza	0,1657 - 2,093	0,9051 - 20,10	0,1917 - 2,240
			0,1635 0,03204 - 0,8339

Tabla 5.3: Datos individuales de edad de inicio de la sintomatología, supervivencia e intervalo de supervivencia de los ratones SOD1-G93A estudiados

Total de ratones macho SOD1-G93A

Machos Tratados	Edad de inicio (días)	Tiempo entre aplicación de VP1.15 y muerte (días)	Supervivencia (días)	Machos no Tratados	Edad de inicio (días)	Tiempo entre aplicación de VP1.15 y muerte (días)	Supervivencia (días)
	84	58	143		84	25	109
	84	37	121		84	50	134
	85	54	140		85	31	116
	82	68	151		82	50	132
	84	29	113		84	43	127
	86	37	123		86	38	124
	86	37	123		86	46	132
	86	54	141		86	49	135
	86	52	138		86	36	122
	84	43	129		85	53	139
	90	49	137		90	13	103
Media	85,18	47,09		Media	85,27	39,45	
DS	2,04	11,52		DS	2,00	12,43	

Ratones macho SOD1-G93A hermanos de camada

Machos Tratados	Edad de inicio (días)	Tiempo entre aplicación de VP1.15 y muerte (días)	Supervivencia (días)	Machos no Tratados	Edad de inicio (días)	Tiempo entre aplicación de VP1.15 y muerte (días)	Supervivencia (días)
	84	58	143		84	25	109
	84	37	121		84	50	134
	85	54	140		85	31	116
	82	68	151		82	50	132
	84	29	113		84	43	127
	90	49	137		90	13	103
Media	84,83	49,16		Media	84,83	35,33	
DS	2,7	14,22		DS	2,71	14,92	

Tabla 5.4: Análisis de la disminución de la masa corporal (al 90% de la masa inicial) sobre el total de los ratones SOD1-G93A tratados y no tratados.

	Hembras (n=30)	Machos (n=22)	Total de ratones (n=52)	Hembras T (n=15)	Machos T (n=11)	Hembras NT (n=15)	Machos NT (n=11)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,6129	5,843	2,551	1,007		3,684	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,4337	0,0156	0,1102	0,3156		0,0549	
Significancia	NS	S(*)	NS	NS		NS	
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,6533	4,822	3,817	0,2696		2,325	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,4189	0,0281	0,0507	0,6036		0,1273	
Significancia	NS	S(*)	NS	NS		NS	
Mediana (disminución en 10% de la masa inicial)							
No tratados	40,0	28,0	33,0	42,0	40,0	40,0	28,0
Tratados	42,0	40,0	41,0				
Ratio	0,9524	0,7000	0,8049	1,050		1,429	
95% Intervalo de confianza	0,4635 -1,441	0,2753 - 1,125	0,2274 - 1,382	0,5907 -1,509		0,9793 -1,878	
Riesgo relativo							
Ratio	1,379	3,834	1,651	0,6311		0,3735	
95% CI of ratio	0,6167 - 3,084	1,289 -11,40	0,8924 - 3,054	0,2568 -1,551		0,1367 -1,021	

Tabla 5.5: Análisis de la disminución de la masa corporal (al 90% de la masa inicial) sobre los ratones SOD1-G93A hermanos de camada tratados y no tratados.

	Hembras (n=12)	Machos (n=12)	Total de ratones (n=24)	Hembras T (n=6)	Machos T (n=6)	Hembras NT (n=6)	Machos NT (n=6)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,009760	3,426	1,082	0,7472		0,8228	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,9213	0,0642	0,2981	0,3874		0,3644	
Significancia	NS	NS	NS	NS		NS	
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,3133	1,829	2,280	0,3224		0,2727	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,5757	0,1762	0,1311	0,5702		0,6015	
Significancia	NS	NS	NS	NS		NS	
Mediana (disminución en 10% de la masa corporal)							
No tratados	37,0	33,0	33,0	41,0	44,0	37,5	33,0
Tratados	41,0	44,0	42,5				
Ratio	0,9146	0,7500	0,7765	0,918	0,918	1,136	
95% Intervalo de confianza	0,5921 - 1,237	0,4605 - 1,039	0,3429 - 1,210	0,6266 - 1,237	0,6266 - 1,237	0,8312 - 1,442	
Riesgo relativo							
Ratio	0,9401	4,390	1,647	1,872	1,872	0,5297	
95% CI of ratio	0,2763 – 3,199	0,9166 – 21,03	0,6432 – 4,220	0,4517 – 7,759	0,4517 – 7,759	0,1342 – 2,091	

Tabla 5.6: Análisis de la evolución neurológica a través de la aparición de cifosis en el total de ratones SOD1-G93A

	Hembras (n=30)	Machos (n=22)	Total de ratones (n=52)	Hembras T (n=15)	Machos T (n=11)	Hembras NT (n=15)	Machos NT (n=11)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,3755	4,817	2,121	0,4942		11,73	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,5400	0,0282	0,1453	0,4820		0,0006	
Significancia	NS	S(*)	NS	NS		S(***)	
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi cuadrado	0,2686	3,422	2,354	1,171		11,68	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,6043	0,0643	0,1250	0,2791		0,0006	
Significancia	NS	NS	NS	NS		S(***)	
Mediana (aparición de cifosis)							
No tratados	50,0	33,0	43,0	48,0		50,0	
Tratados	48,0	44,0	46,5	44,0		33,0	
Ratio	1,042	0,7500	0,9247	01,091		1,515	
95% Intervalo de confianza	0,5528 -1,531	0,3437 -1,156	0,3536 -1,496	0,6533 -1,29		1,066 -1,964	
Riesgo relativo							
Ratio	1,289	3,359	1,586	0,7184		0,1303	
95% CI of ratio	0,5725 to 2,901	1,138 to 9,911	0,826 to 2,950	0,2857 to 1,806		0,04056 to 0,4183	

Tabla 5.7: Análisis de la evolución neurológica a través de la aparición de cifosis en los ratones SOD1-G93A hermanos de camada

	Hembras (n=12)	Machos (n=12)	Ratones totales (n=24)	Hembras T (n=6)	Machos T (n=6)	Hembras NT (n=6)	Machos NT (n=6)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,4365	1,989	1,832	0,002406		3,950	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,5088	0,1584	0,1758	0,9609		0,0469	
Significancia	NS	NS	NS	NS		S(*)	
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,2338	1,327	1,240	0,2432		3,454	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,6287	0,2494	0,2656	0,6219		0,0631	
Significancia	NS	NS	NS	NS		NS	
Mediana (aparición de cifosis)							
No tratados	55,5	49,5	44,0	52,5	49,5	55,0	41,0
Tratados	52,5	41,0	51,5				
Ratio	1,057	0,8283	0,8544	1,061		1,354	
95% Intervalo de confianza	0,7346 - 1,380	0,5388 - 1,118	0,4208 - 1,288	0,7554 - 1,366		1,048 - 1,659	
Riesgo relativo							
Ratio	1,599	3,024	1,968	1,034		0,1980	
95% Intervalo de Confianza	0,3971 - 6,440	0,6497 - 14,08	0,7385 - 5,242	0,2721 - 3,930		0,04010 - 0,9778	

Tabla 5.8: Análisis de la debilidad muscular en los ratones SOD1-G93A, a través de la medición de la resistencia durante 90 segundos en el test de la rejilla

	Hembras (n=30)	Machos (n=22)	Total de ratones (n=52)	Hembras T (n=15)	Machos T (n=11)	Hembras NT (n=15)	Machos NT (n=11)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,2178	5,428	3,451	0,1373		4,331	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,6407	0,0198	0,0632	0,7109		0,0374	
Significancia	NS	S(*)	NS	NS		S(*)	
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,07159	,650	3,517	0,2845		4,531	
Grados de libertad	1	1	1	1		1	
Valor P	0,7890	0,0175	0,0607	0,5938		0,0333	
Significancia	NS	S(*)	NS	NS		S(*)	
Mediana (resistencia durante 90 segundos en el test de la rejilla)							
No tratados	35,0	21,0	28,0	28,0	35,0	35,0	21,0
Tratados	28,0	35,0	31,5				
Ratio	1,250	0,6000	0,8889	0,8000		1,667	
95% Intervalo de confianza	0,7800 -1,720	0,1856 -1,014	0,3244 - 1,453	0,3520 -1,248		1,234 -2,100	
Riesgo relativo							
Ratio	1,250	4,519	2,004	1,207		0,2884	
95% CI of ratio	0,4894 -3,194	1,270 -16,08	0,9624 - 4,173	0,4466 - 3,261		0,08942 - 0,9302	

Tabla 5.9: Análisis de la debilidad muscular en ratones SOD1-G93A hermanos de camada, a través de la medición de la resistencia durante 90 segundos en el test de la rejilla

	Hembras (n=12)	Machos (n=12)	Total de ratones (n=24)	Hembras T (n=6)	Machos T (n=6)	Hembras NT (n=6)	Machos NT (n=6)
Test Log-rank (Mantel Cox)							
Chi Cuadrado	0,04774	8,008	3,268	2,336	2,336	3,115	3,115
Grados de libertad	1	1	1	1	1	1	1
Valor P	0,8270	0,0047	0,0706	0,1264	0,1264	0,0776	0,0776
Significancia	NS	S(**)	NS	NS	NS	NS	NS
Test Gehan-Breslow- Wilcoxon							
Chi Cuadrado	0,1678	7,509	5,042	1,877	1,877	3,494	3,494
Grados de libertad	1	1	1	1	1	1	1
Valor P	0,6821	0,0061	0,0247	0,1707	0,1707	0,0616	0,0616
Significancia	NS	S(**)	S(*)	NS	NS	NS	NS
Mediana (resistencia durante 90 segundos en el test de la rejilla)							
No tratados	28,0	14,0	21,0	31,5	38,5	28,0	14,0
Tratados	31,5	38,5	35,0				
Ratio	0,8889	0,3636	0,6000	0,8182	0,8182	2,000	2,000
95% Intervalo de confianza	0,5837 - 1,194	0,05849 - 0,6688	0,1664 - 1,034	0,5130 - 1,123	0,5130 - 1,123	1,695 - 2,305	1,695 - 2,305
Riesgo relativo							
Ratio	1,180	16,88	2,757	3,546	3,546	0,2174	0,2174
95% Intervalo de confianza	0,2667 - 5,225	2,384 - 119,5	0,9182 - 8,278	0,6995 - 17,98	0,6995 - 17,98	0,03995 - 1,184	0,03995 - 1,184

Tabla 5.10: Estadística aplicada a los niveles encontrados de AMPc en los diferentes tejidos de los animales estudiados.

	Hembras T vs Hembras NT vs Hembras N	Machos T vs Machos NT vs Machos N	Ratones T vs Ratones NT vs Ratones N
Encéfalo			
Valor P	0,0779 NS	0,3265 NS	0,6603 NS
Significancia			
Estadístico Kruskal-Wallis			
Mediana	1,946	1,211	1,219
Media	1,961	1,325	1,348
Desviación estandar	0,9531	1,290	1,719
Error estandar	0,3891	0,03229	0,7537
		0,1318	0,2176
		0,03938	0,2568
		0,03029	0,6843
Médula			
Valor P	0,5738 NS	0,9862 NS	0,6481 NS
Significancia			
Estadístico Kruskal-Wallis			
Mediana	1,681	1,545	1,613
Media	3,988	2,029	2,264
Desviación estandar	2,103	1,948	2,968
Error estandar	1,127	0,7653	1,777
		0,5947	1,388
		0,4419	0,5668
		0,3434	0,7254
		0,1817	0,8913
Músculo			
Valor P	0,8145 NS	0,1622 NS	0,4596 NS
Significancia			
Estadístico Kruskal-Wallis			
Mediana	4,816	2,983	3,589
Media	4,737	3,437	4,277
Desviación estandar	1,719	3,478	3,930
Error estandar	0,7020	0,5970	1,489
		0,2437	0,5185
		0,3861	0,4299
		0,3104	0,7273
Hígado			
Valor P	0,7066 NS	0,3845 NS	0,6609 NS
Significancia			
Estadístico Kruskal-Wallis			
Mediana	3,740	1,666	1,893
Media	3,200	1,711	2,456
Desviación estandar	1,083	0,1060	1,067
Error estandar	0,6252	0,0612	0,4357
		0,08492	0,121
		0,01514	0,4577
		0,02142	1,294
		0,1575	2,692
		1,575	2,635
		1,741	1,711
		1,912	0,8284
		0,6944	0,6609
		1,681	0,8284
		2,504	1,711
		1,626	2,105
		0,9386	1,121
		0,1287	0,4577
		0,1287	0,6470

Tabla 5.9: Estadística aplicada a los niveles de expresión de β -catenina encontrados en los diferentes tejidos de los animales estudiados.

	Hembras T	Hembras NT	Machos N	Machos T	Machos NT	Ratones T	Ratones NT	Ratones N
Encéfalo								
Valor P	0,3679	NS	0,6514	NS	0,6514	0,4374	NS	
Significancia	2,000		0,8571		0,8571	1,654		
Estadístico Kruskal-Wallis						2,966		3,163
Mediana	2,966	2,982	3,236	3,062	3,255	3,200	3,118	3,199
Media	2,966	2,982	3,236	3,062	3,255	3,014	3,118	3,199
Desviación estandar	0,06647	0,3429	0,2680	0,3528	0,1110	0,2145	0,2611	0,1822
Error estandar	0,04700	0,2425	0,1895	0,2495	0,07850	0,1073	0,1305	0,09108
Médula								
Valor P	0,4621	NS	0,1801	NS	0,1801	0,1801	NS	
Significancia	1,544		3,429		3,429	3,429		
Estadístico Kruskal-Wallis						3,326		3,232
Mediana	3,257	3,367	3,205	3,356	3,359	3,390	3,363	2,755
Media	3,257	3,367	3,205	3,356	3,359	3,306	3,363	2,755
Desviación estandar	0,1888	0,03253	0,07495	0,1329	0,04384	0,1452	0,03185	0,5224
Error estandar	0,1335	0,0230	0,05300	0,09400	0,03100	0,0758	0,01593	0,2612
Músculo								
Valor P	0,1801	NS	0,1017	NS	0,1017	0,8741	NS	
Significancia	3,429		4,571		4,571	0,2692		
Estadístico Kruskal-Wallis						0,7785		0,5300
Mediana	1,116	0,8545	0,4640	0,6970	0,8840	0,8690	0,8690	0,6470
Media	1,116	0,8545	0,4640	0,6970	0,8840	0,9063	0,8693	0,6470
Desviación estandar	0,4971	0,08980	0,09334	0,1358	0,09051	0,3833	0,07556	0,3238
Error estandar	0,3515	0,06350	0,06600	0,09600	0,06400	0,1916	0,03778	0,1869
Hígado								
Valor P	0,3012	NS	0,7408	NS	0,7408	0,2673	NS	
Significancia	2,400		0,6000		0,6000	2,673		
Estadístico Kruskal-Wallis						3,309		2,939
Mediana	3,309	3,266	3,137	3,306	2,722	3,266	3,172	2,939
Media	3,309	3,266	3,137	3,306	2,722	3,307	3,172	2,939
Desviación estandar	0,09263	0,03889	0,0	0,09899	0,5035	0,07829	0,3110	0,2807
Error estandar	0,06550	0,02750	0,0	0,07000	0,3560	0,03914	0,1555	0,1985

Tabla 5.10: Estadística aplicada a los niveles de expresión de CREB encontrados en los diferentes tejidos de los animales estudiados.

	Hembras T		Hembras NT		Machos T		Machos NT		Ratones T		Ratones NT		Ratones N	
Encéfalo														
Valor P			0,3679	NS			0,3679	NS			0,5836	NS		
Significancia			2,000				2,000				1,077			
Estadístico Kruskal-Wallis														
Mediana	0,7665		0,7215	0,5175	0,3180		0,7790	0,7075	0,4975		0,7215		0,6395	
Media	0,7665		0,7215	0,5175	0,3180		0,7790	0,7075	0,5423		0,7503		0,6125	
Desviación estandar	0,2188		0,003536	0,2524	0,08627		0,6124	0,1761	0,2909		0,3551		0,2088	
Error estandar	0,1505		0,002500	0,1785	0,0610		0,4350	0,1245	0,1455		0,1776		0,1044	
Médula														
Valor P			1,0000	NS			0,8669	NS			0,7939	NS		
Significancia			0,0000				0,2857				0,4615			
Estadístico Kruskal-Wallis														
Mediana	0,4100		0,3165	0,3645	0,3585		0,3080	0,2850	0,3585		0,3165		0,2850	
Media	0,4100		0,3165	0,3645	0,3585		0,3080	0,2850	0,3843		0,3123		0,3248	
Desviación estandar	0,1937		0,003536	0,2737	0,004950		0,08061	0,1103	0,1158		0,04684		0,1764	
Error estandar	0,1370		0,002500	0,1935	0,0035		0,05700	0,0780	0,05789		0,02342		0,08821	
Músculo														
Valor P			0,6514	NS			0,6514	NS			0,4379	NS		
Significancia			0,8571				0,8571				1,651			
Estadístico Kruskal-Wallis														
Mediana	0,1725		0,2250	0,2285	0,2395		0,2795	1,499	0,2105		0,2490		0,2380	
Media	0,1725		0,2250	0,2285	0,2395		0,2795	1,499	0,2060		0,2523		0,2337	
Desviación estandar	0,06718		0,01838	0,04738	0,05445		0,02758	1,765	0,06316		0,0383		0,01986	
Error estandar	0,0475		0,0130	0,0335	0,0385		0,0195	1,248	0,03158		0,01841		0,01146	
Hígado														
Valor P			0,2331	NS			0,4966	NS			0,6065	NS		
Significancia			3,000				1,400				1,000			
Estadístico Kruskal-Wallis														
Mediana	2,069		1,251	1,337	1,767		2,525	2,080	2,138		1,947		1,709	
Media	2,069		1,251	1,337	1,767		2,525	2,080	2,226		1,888		1,709	
Desviación estandar	0,09829		0,3104	0,0	1,096		0,1428	0,0	0,2821		0,7618		0,5254	
Error estandar	0,06950		0,2195	0,0	0,7750		0,1010	0,0	0,1629		0,3809		0,3715	

Tabla 5.14: Expresión de GSK-3, P Ser9 GSK-3, PDE-7 y GFAP en ratones SOD1-G93A tratados y no tratados con VP15.1, respecto a los valores normales respectivos

		Encéfalo		Médula	
		Valor relativo	Valor relativo %	Valor relativo	Valor relativo %
HEMBRAS Nivel de expresión de GSK3αβ	Tratadas No tratadas Normales	0,5994 0,8028 1	59,94 80,28 100	0,7012 0,8888 1	70,12 88,88 100
MACHOS Nivel de expresión de GSK3αβ	Tratados No tratados Normales	1,2239 0,8451 1	122,39 84,51 100	0,8593 0,8691 1	85,93 86,91 100
HEMBRAS Nivel de expresión de P9-GSK3	Tratadas No tratadas Normales	0,6915 0,9425 1	69,15 94,25 100	4,0167 2,8553 1	401,67 285,53 100
MACHOS Nivel de expresión de P9-GSK3	Tratados No tratados Normales	0,7735 0,7393 1	77,35 73,93 100	2,7233 2,6208 1	272,33 262,08 100
HEMBRAS Nivel de expresión de PDE7b	Tratadas No tratadas Normales	1,7202 1,9206 1	172,02 192,06 100	0,6600 0,7353 1	66,00 73,53 100
MACHOS Nivel de expresión de PDE7b	Tratados No tratados Normales	2,0688 1,8321 1	206,88 183,21 100	1,7719 1,5380 1	177,19 153,80 100
HEMBRAS Nivel de expresión de GFAP	Tratadas No tratadas Normales	1,7878 2,9442 1	178,78 294,42 100	1,1138 1,8920 1	111,38 189,2 100
MACHOS Nivel de expresión de GFAP	Tratados No tratados Normales	0,6081 1,2185 1	60,81 121,85 100	1,7276 2,0331 1	172,76 203,31 100

